



**Etude du passage d'un phospholipide structuré “
AceDoPC ” à travers une barrière hémato-encéphalique
reconstituée in vitro et de sa biodisponibilité cérébrale
in vivo chez le rat**

Mayssa Hachem

► **To cite this version:**

Mayssa Hachem. Etude du passage d'un phospholipide structuré “ AceDoPC ” à travers une barrière hémato-encéphalique reconstituée in vitro et de sa biodisponibilité cérébrale in vivo chez le rat. Biologie moléculaire. INSA de Lyon, 2015. Français. NNT : 2015ISAL0044 . tel-01368259

HAL Id: tel-01368259

<https://theses.hal.science/tel-01368259>

Submitted on 19 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présentée devant

**L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES
DE LYON**

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR

Discipline : Biochimie

par

Mayssa HACHEM

**Etude du passage d'un phospholipide structuré
« AceDoPC » à travers une barrière hémato-encéphalique
reconstituée *in vitro* et de sa biodisponibilité cérébrale
in vivo chez le rat**

Soutenue le 22 Mai 2015 devant la commission d'examen

JURY

Mme. le Pr N. Bernoud-Hubac (Directrice de thèse)

M. G. Breton (Membre invité)

M. le Pr M. Lagarde (Président)

M. le Dr J.C. Martin (Rapporteur)

M. le Pr M. Narce (Rapporteur)

Mme. le Dr M. Picq (Co-directrice de thèse)

M. le Dr F. Thiès (Rapporteur)

**Travail effectué au sein du laboratoire «Cardiovasculaire, Métabolisme, diabétologie et Nutrition» (CarMeN, INSERM U1060) à l'INSA de Lyon.
Thèse financée par la société «Polaris» (Pleuven, France).**

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON http://www.edchimie-lyon.fr Sec : Renée EL MELHEM Bat Blaise Pascal 3 ^e étage Insa : R. GOURDON	M. Jean Marc LANCELIN Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE http://edeea.ec-lyon.fr Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN eea@ec-lyon.fr	M. Gérard SCORLETTI Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60.97 Fax : 04 78 43 37 17 Gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION http://e2m2.universite-lyon.fr Insa : H. CHARLES	Mme Gudrun BORNETTE CNRS UMR 5023 LEHNA Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Forel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 06.07.53.89.13 e2m2@univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ http://www.ediss-lyon.fr Sec : Insa : M. LAGARDE	Mme Emmanuelle CANET-SOULAS INSERM U1060, CarMeN lab, Univ. Lyon 1 Bâtiment IMBL 11 avenue Jean Capelle INSA de Lyon 69621 Villeurbanne Tél : 04.72.68.49.09 Fax : 04 72 68 49 16 Emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr
INFOMATHS	INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES http://infomaths.univ-lyon1.fr Sec : Renée EL MELHEM Bat Blaise Pascal 3 ^e étage infomaths@univ-lyon1.fr	Mme Sylvie CALABRETTO LIRIS – INSA de Lyon Bat Blaise Pascal 7 avenue Jean Capelle 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43.80.46 Fax 04 72 43 16 87 Sylvie.calabretto@insa-lyon.fr
Matériaux	MATERIAUX DE LYON http://ed34.universite-lyon.fr Sec : M. LABOUNE PM : 71.70 – Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry Ed.materiaux@insa-lyon.fr	M. Jean-Yves BUFFIERE INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 71.70 Fax 04 72 43 85 28 Ed.materiaux@insa-lyon.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE http://mega.universite-lyon.fr Sec : M. LABOUNE PM : 71.70 – Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry mega@insa-lyon.fr	M. Philippe BOISSE INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 Philippe.boisse@insa-lyon.fr
ScSo	ScSo* http://recherche.univ-lyon2.fr/scso/ Sec : Viviane POLSINELLI Brigitte DUBOIS Insa : J.Y. TOUSSAINT viviane.polsinelli@univ-lyon2.fr	Mme Isabelle VON BUELTZINGLOEWEN Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.77.23.86 Fax : 04.37.28.04.48 isavonb@dbmail.com

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

REMERCIEMENTS

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à **Dr. Hubert Vidal**, le directeur du laboratoire de recherche CarMeN, pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant dans son laboratoire.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement **Pr. Nathalie Bernoud-Hubac** et **Dr Madeleine Picq** pour m'avoir encadré pendant ces quelques années depuis mon arrivée au laboratoire pour mon stage de master recherche. Je vous remercie particulièrement pour vos rigueurs scientifiques, vos exigences, vos disponibilités, vos patiences et vos encouragements. Merci de m'avoir guidée tout au long de ces années. Alors pour tout ce que vous m'avez apporté, vous étiez à l'écoute, toujours prêts à donner des conseils. Je tiens à vous remercier particulièrement pour les expériences d'enseignement que vous m'avez confiées au sein de l'INSA. Je tenais à vous dire un grand MERCI.*

*J'adresse mes remerciements au **Pr. Michel Lagarde** pour vos conseils scientifiques ainsi que vos remarques qui ont contribué à la qualité de ce travail. Vous m'avez transmis votre passion pour l'AceDoPC, votre molécule miracle. Vous me faites l'honneur d'être le président dans ce jury.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à la société française 'Polaris' qui a financé ce projet de recherche. Mes sincères remerciements à **M. Gildas Breton**.*

*Je remercie **M. le Docteur Frank Thiès**, **M. le Professeur Michel Narce** et **M. le Docteur Jean-Charles Martin** qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail. Trouvez ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.*

*Je voudrais remercier **Dr. Philippe Moulin** pour vos remarques scientifiques et vos critiques constructifs lors des réunions mensuelles de l'équipe. Vos remarques ont abouti bien à la progression de mes travaux de recherche.*

*Je remercie **Dr. Alain Géloën**, pour m'avoir permis de faire l'étude in vivo chez les rats; pour m'avoir guidé dans le monde des rongeurs, pour sa rigueur scientifique, pour nos petites discussions scientifiques très enrichissantes et passionnantes mais surtout pour sa très grande sympathie et son bon humeur communicatif.*

*Je tiens également à remercier **Pr. Agnès Girard-Egrot** et **Dr. Jacques Bodennec** qui ont accepté d'être membre du comité de suivi de ma thèse pendant ces quelques années.*

*Je remercie **Dr. Evelyne Véricel** et **Dr. Catherine Calzada** pour m'avoir guidé dans la manipulation du sang humain.*

*Mes vifs remerciements s'adressent à **Dr. Fabien Gosselet** avec qui j'ai travaillé sur le modèle de barrière hémato-encéphalique à Lens.*

*Un grand merci à **Dr. Hayate Kouchi** avec qui j'ai travaillé au laboratoire Neurosciences. Merci pour ta grande patience.*

*Je remercie les collègues du deuxième étage du bâtiment IMBL : **Baptiste** qui ne cessait pas à critiquer les 'Rrrr' que je rrrroulais, **Patricia** pour sa gentillesse et son calme, **Patrick** pour les moments 'HELP' informatique, **Dr Miao** avec qui j'ai passé des soirées sur la paillasse en me souvenant bien de son expression 'Je ne vois pas la fin de ma thèse !', **Dr Mounir** pour sa sympathie, **Pr Michel Guichardant** pour nos discussions enrichissantes.*

*Merci à mes collègues du laboratoire pour leur apport et les bons moments passés ensemble (**Charlotte, Huy, Jérémie, Manon, Maud, Amanda**...). Je remercie tous les permanents du laboratoire qui ont apporté de près ou de loin à ce travail et pour leur sympathie sans oublier*

également les secrétaires du laboratoire et du département (**Marina, Carine, Marilyne, Samia, Sandrine**).

Mention spéciale à «la communauté libanaise» en France (**Racha El-Itri, Alaa Barghachoun, Maya Omar, Manar Awada, Jessica El-khoury, Christine Matta, Majdi Chamati, Mario et Yvona Al Halbi, Chadi Jaber..**).

Enfin, je ne saurais conclure mes remerciements sans exprimer ma profonde reconnaissance et mon affection à : Mon mari **Dhafar**, ton soutien et tes encouragements ont été plus que déterminant dans la réussite de mon travail. A mon fils **Hachem**, tu étais le mot clé pour la réalisation de cette thèse!! A mon petit bébé **Prince** qui témoigne aujourd'hui ma soutenance de thèse. A ma famille, plus particulièrement **ma mère et mon père**, pour leur amour, leur soutien moral inconditionnel et leur patience jusqu'au bout. Mes sœurs (**Souheir, Chahnaz**) et mes frères (**Ahmad, Majed et Maher**).

RESUME

L'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6n-3) est le principal acide gras oméga-3 des tissus cérébraux et est essentiel au développement et aux fonctions du cerveau. Une diminution de la concentration cérébrale du DHA est observée chez les patients souffrant de maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Un apport ciblé du DHA au cerveau pourrait compenser ces carences. Le DHA sanguin est transporté à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) plus efficacement lorsqu'il est estérifié en position *sn*-2 de la lysophosphatidylcholine (lysoPC). Nous produisons au laboratoire une phosphatidylcholine structurée pour mimer la 2-docosahexaénoyl-lysoPC (lysoPC-DHA), nommée AceDoPC (1-acétyl,2-docosahexaénoyl-glycérophosphocholine), qui peut être considérée comme une forme stabilisée de la lysoPC-DHA physiologique et qui est neuroprotectrice dans l'accident ischémique cérébral. Le premier objectif de ce travail a été de comparer le passage du DHA marqué non estérifié ou estérifié dans l'AceDoPC ou dans une phosphatidylcholine (PC-DHA), lié au plasma, à travers un modèle *in vitro* de la BHE. Ce modèle est constitué d'une co-culture de cellules endothéliales des capillaires cérébraux bovins et de cellules gliales de rats nouveau-nés. Nous montrons un passage préférentiel à travers la monocouche endothéliale et une captation préférentielle par les cellules gliales de l'AceDoPC comparativement au DHA non estérifié et à la PC-DHA. Nous montrons également que l'AceDoPC est hydrolysée, en partie, en lysoPC-DHA et que les phosphatidylcholines (PC) et les phosphatidyléthanolamines (PE) sont les classes lipidiques les plus marquées des cellules endothéliales et des cellules gliales. L'AceDoPC est aussi présente, en partie, sous forme de molécule entière dans les cellules. Le deuxième objectif de ce travail a été de confirmer si cette préférence pour la forme AceDoPC était également observée *in vivo*. Nous avons donc étudié, chez des rats âgés de 20 jours, la captation cérébrale des différentes formes d'apport du DHA précédemment utilisées (DHA, AceDoPC, PC-DHA). Nous démontrons que l'AceDoPC apporte le DHA au cerveau plus efficacement que les autres formes d'apport de DHA et que cette préférence pour l'AceDoPC est spécifique au cerveau puisqu'elle n'est pas observée pour les autres organes étudiés. L'AceDoPC est trouvée, en partie, sous forme intacte dans le cerveau. L'autoradiographie *ex vivo* du cerveau de rat révèle que le DHA provenant de l'AceDoPC est localisé dans des régions cérébrales spécifiques jouant un rôle important dans la mémoire et les fonctions cognitives. Enfin, en utilisant des approches de modélisation moléculaire, nous démontrons que les potentiels électrostatiques et hydrophobes sont distribués de manière très similaire au niveau des surfaces de l'AceDoPC et de la lysoPC-DHA. En conclusion, nos études montrent que l'AceDoPC est un transporteur privilégié et spécifique du DHA au cerveau. En considérant les rôles essentiels du DHA pour le cerveau, cette nouvelle approche de ciblage cérébral du DHA offre des perspectives prometteuses dans le développement de stratégies préventives et thérapeutiques pour les maladies neurologiques.

Mots clés : Acide docosahexaénoïque, lysophosphatidylcholine, 1-acétyl,2-docosahexaénoyl-glycérophosphocholine, transport, barrière hémato-encéphalique, cerveau.

ABSTRACT

Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) is the main essential omega-3 fatty acid in brain tissues required for normal brain development and function. A decrease in the cerebral concentration of DHA is observed in patients suffering from neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's. Targeted intake of DHA to the brain could compensate for these deficiencies. Blood DHA is transported across the blood-brain barrier (BBB) more efficiently when esterified at the *sn*-2 position of lysophosphatidylcholine (lysoPC). We produce in the laboratory a structured phosphatidylcholine to mimic 2-docosahexaenoyl-lysoPC (lysoPC-DHA), named AceDoPC (1-acetyl,2-docosahexaenoyl-glycerophosphocholine), that may be considered as a stabilized form of the physiological lysoPC-DHA and that is neuroprotective in experimental ischemic stroke. The first objective of this work was to compare the passage of either labeled unesterified DHA or DHA esterified in AceDoPC or in phosphatidylcholine (PC-DHA), bound to plasma, through an *in vitro* model of the BBB. This model is constituted of a co-culture of bovine brain capillary endothelial cells and glial cells from newborn rats. We show a preferential passage through the endothelial monolayer and a preferential uptake by glial cells of AceDoPC compared to unesterified DHA and PC-DHA. We also show that AceDoPC is hydrolyzed, partly, into lysoPC-DHA and that phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) are the most labeled lipid classes in endothelial cells and glial cells. AceDoPC is found, partly, as a whole molecule in the cells. The second objective of this work was to confirm whether this preference for AceDoPC was also observed *in vivo*. We studied, in 20 days old rats, the brain uptake of different forms of DHA previously used (DHA, AceDoPC, PC-DHA). We demonstrate that AceDoPC provided the brain with DHA more efficiently than the other forms of DHA and that this preference for AceDoPC is specific for the brain because it is not observed for other studied organs. AceDoPC is found, partly, intact in the brain. *Ex vivo* autoradiography of rat brain reveals that DHA provided from AceDoPC is localized in specific brain regions playing key roles in memory and cognitive functions. Finally, by using molecular modelling approaches, we demonstrate that electrostatic and hydrophobic potentials are distributed very similarly at the surfaces of AceDoPC and lysoPC-DHA. In conclusion, our studies demonstrate that AceDoPC is a privileged and specific carrier of DHA to the brain. Considering the essential roles of DHA for the brain, this new approach to target the brain with DHA offers promising perspectives in the development of preventive and therapeutic strategies for neurological diseases.

Keywords: Docosahexaenoic acid, lysophosphatidylcholine, 1-acetyl,2-docosahexaenoyl-glycerophosphocholine, transport, blood-brain barrier, brain.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS.....	17
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	19
ABREVIATIONS	23
INTRODUCTION	27
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	33
Chapitre I: Les acides gras polyinsaturés et les phospholipides	35
I.1 Les acides gras polyinsaturés (AGPI).....	35
I.1.1 Historique et Généralités sur les acides gras	35
I.1.2 Biosynthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI)	37
I.1.3 Sources et recommandations en AGPI.....	40
I.2 Rôles physiologiques des AGPI n-3	42
I.2.1.1 AGPI n-3 et systèmes cardiovasculaires	42
I.2.1.2 AGPI n-3 et vision.....	43
I.2.1.3 AGPI n-3 et fonctionnement cérébral	44
I.3 Les phospholipides	47
I.3.1 Classification des glycérophospholipides	47
I.3.2 Biosynthèse des glycérophospholipides	49
I.3.2.1 Biosynthèse des phosphatidylcholines	50
I.3.2.2 Biosynthèse des phosphatidyléthanolamines	51
I.3.2.3 Biosynthèse des phosphatidylsérines et phosphatidylinositols	51
I.3.2.4 Biosynthèse des phosphatidylglycérols.....	52
I.3.3 Glycérophospholipides et distribution cérébrale.....	52
I.3.4 Remodelage des phospholipides	53
I.3.4.1 Voies de dé-acylation/ré-acylation.....	53
I.3.4.2 Voies de transacylation	54
I.3.4.3 Implication des phospholipases dans la libération des AGPI des glycérophospholipides membranaires	57
I.3.5 Les Lysophosphatidylcholines	60
I.3.5.1 Biosynthèse des lysophosphatidylcholines	60
I.3.5.2 Propriétés des lysophosphatidylcholines.....	61
Chapitre II: L'acide docosahexaénoïque	62

I.1 Incorporation du DHA dans les phospholipides membranaires du cerveau.....	62
I.2 Métabolisme oxygéné du DHA.....	64
I.2.1 Oxydation enzymatique du DHA : Voie des lipoxgénases	64
I.2.1.1 Métabolites mono-hydroxylés du DHA	64
I.2.1.2 Métabolites di-hydroxylés du DHA	65
I.2.1.3 Résolvines	69
I.2.2 Oxydation non-enzymatique du DHA.....	71
I.3 Effets neuroprotecteurs du DHA	72
I.4 Passage du DHA à travers la barrière hémato-encéphalique	74
I.4.1 Transport du DHA non estérifié.....	74
I.4.1.1 Premier concept : la diffusion passive.....	74
I.4.1.2 Deuxième concept : un processus facilité	75
I.4.2 Transport du DHA estérifié dans une lysophosphatidylcholine.....	75
Chapitre III: La Barrière Hémato-Encéphalique (BHE).....	79
I.1 Concept de barrière	79
I.2 La BHE: une barrière physique.....	80
I.2.1 Cellules endothéliales des capillaires cérébraux (CECC)	80
I.2.1.1 Jonctions Adhérentes.....	81
I.2.1.2 Jonctions serrées.....	81
I.3 La BHE: une barrière métabolique.....	83
I.3.1 Les enzymes	83
I.3.1.1 Monoamine oxydases (MAOs):	83
I.3.1.2 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT).....	83
I.3.1.3 Phosphatase alcaline.....	83
I.3.1.4 Enzymes de détoxification	83
I.3.2 Les pompes d'efflux.....	84
I.3.2.1 Les transporteurs ATP-Binding Cassette (ABC)	84
I.3.2.2 La P-glycoprotéine (P-gp)	86
I.4 Induction des propriétés de la BHE par les astrocytes	87
Chapitre IV: Phospholipide structuré à DHA : AceDoPC	88
I.1 Intérêt d'un nouveau phospholipide structuré « AceDoPC »	88
I.2 Propriétés biologiques de l'AceDoPC.....	89
I.2.1 Effet de l'AceDoPC sur l'ischémie cérébrale chez le rat.....	89
I.2.2 Effet Anti-PAF de l'AceDoPC.....	90

I.2.3	Comportement de l'AceDoPC dans le sang humain	90
I.3	Etude du métabolisme compartimental chez l'Homme.....	91
MATERIELS ET METHODES		93
Chapitre 1: Matériels.....		95
I.1	Produits & fournisseurs.....	95
I.2	Appareils	96
Chapitre 2 : Méthodes		97
I.1	Synthèse de phospholipides structurés à DHA	97
I.1.1	Synthèse de 1-acétyl,2-[¹⁴ C]docosahexaénoyl-glycérophosphocholine ou [¹⁴ C]-AceDoPC.....	97
I.1.1.1	Vérification de la pureté de l'AceDoPC synthétisée.....	98
I.1.1.2	Confirmation de la structure de l'AceDoPC	100
I.1.1.3	Modélisation moléculaire de l'AceDoPC et de la lysoPC-DHA	101
I.1.2	Synthèse de 1-palmitoyl,2-[¹⁴ C]docosahexaénoyl- glycérophosphocholine ou [¹⁴ C]-PC-DHA.....	101
I.2	Etude de passage du DHA, de la PC-DHA et de l'AceDoPC à travers un modèle de barrière hémato-encéphalique reconstituée <i>in vitro</i>	103
I.2.1	Modèle <i>in vitro</i> de BHE	103
I.2.1.1	Cultures des cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins (CECCB)	103
I.2.1.2	Culture des cellules gliales	103
I.2.1.3	Préparation des filtres.....	103
I.2.1.4	Coculture de cellules endothéliales des capillaires cérébraux et de cellules gliales	104
I.2.2	Incubation des cellules avec les substrats marqués : l'AceDoPC, la PC-DHA et le DHA non estérifié	106
I.2.3	Techniques analytiques	107
I.2.3.1	Extraction des lipides des milieux et des cellules	107
I.2.3.2	Méthode de séparation des classes de lipides et quantification de leur radioactivité.....	107
I.3	Etude <i>in vivo</i> de captation cérébrale du DHA	109
I.3.1	Protocole animal.....	109
I.3.2	Techniques analytiques	110
I.3.2.1	Extraction des lipides totaux à partir des tissus et du plasma de rat.	110
I.3.2.2	Séparation des classes lipidiques par CCM et quantification de leur radioactivité.....	110
I.3.2.3	Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).....	110

I.3.3	Autoradiographie cérébrale chez le rat :	112
I.4	Analyse statistique :	113
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....		115
Chapitre 1: Transfert du DHA non estérifié ou estérifié (AceDoPC, PC-DHA) à travers la BHE reconstituée in vitro.....		117
I.1	Etude de l'effet des lipides marqués sur l'intégrité de la BHE	120
I.2	Distribution de la radioactivité des lipides totaux entre les différents compartiments de la coculture	121
I.2.1	Radioactivité des lipides totaux retrouvée dans les milieux supérieur et inférieur	121
I.2.2	Radioactivité des lipides totaux retrouvée dans les cellules endothéliales et les cellules gliales	122
I.2.3	Passage total des substrats à travers la monocouche endothéliale 4h après ajout de [¹⁴ C]-DHA non estérifié, [¹⁴ C]-PC-DHA ou de [¹⁴ C]-AceDoPC dans le milieu supérieur des co-cultures	124
I.3	Distribution de la radioactivité entre les différentes classes des lipides des milieux	125
I.4	Répartition de la radioactivité entre les différentes classes des lipides cellulaires (endothéliales et gliales)	128
I.5	Discussion.....	131
Chapitre 2: Etude in vivo de captation cérébrale du DHA non estérifié ou estérifié (AceDoPC, PC-DHA).....		133
I.1	Cinétique d'incorporation du DHA apporté sous formes de DHA ou d'AceDoPC dans le plasma.....	133
I.2	Cinétique d'incorporation du DHA apporté sous formes de DHA ou d'AceDoPC dans les organes	135
I.3	Distribution de la radioactivité entre les différentes classes des lipides extraits des organes après injection d' [¹⁴C]-AceDoPC ou de [¹⁴C]-DHA	137
I.4	Comparaison de l'incorporation du DHA apporté sous formes de DHA, AceDoPC ou PC-DHA dans le plasma et les organes	140
I.4.1	Comparaison de l'incorporation du DHA apporté sous formes de DHA, AceDoPC ou PC-DHA dans le plasma	140
I.4.2	Comparaison de l'incorporation du DHA apporté sous forme de DHA, AceDoPC ou PC-DHA dans les organes.....	141
I.5	Séparation de l'albumine et des lipoprotéines plasmatiques par chromatographie de gel filtration sur FPLC.....	143
I.6	Imagerie cérébrale ex vivo par autoradiographie cérébrale	145
I.7	Modélisation Moléculaire de l'AceDoPC et de la lysoPC-DHA.....	146
I.8	Discussion	149

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	151
ANNEXE	157
<i>Biodisponibilité chez l'Homme du DHA apporté sous forme de triacylglycérol (TG-DHA), phosphatidylcholine (PC-DHA) et AceDoPC.....</i>	159
I.1 Introduction et objectifs de l'étude.....	159
I.2 Protocole expérimental	159
I.2.1 Synthèse de l' ¹³ C-AceDoPC	160
I.2.2 Productions et analyses structurales de triglycérides (TG) et phosphatidylcholines (PC) à ¹³ C-DHA	161
I.2.2.1 Culture de microalgues.....	162
I.2.2.2 Obtention des ¹³ C-TG-DHA et ¹³ C-PC-DHA	162
I.2.2.3 Analyse structurale des ¹³ C-TG-DHA et ¹³ C-PC-DHA par chromatographie en phase gazeuse (GC)	163
I.2.2.4 Analyse des ¹³ C-TG-DHA et ¹³ C-PC-DHA par résonance magnétique nucléaire	164
I.2.3 Séparation des différents constituants sanguins à partir du sang	164
I.2.4 Analyse des différents constituants sanguins	166
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	169

AVANT-PROPOS

Le travail présenté dans cette thèse a fait l'objet des publications suivantes :

Lagarde M, **Hachem M**, Bernoud-Hubac N, Picq M, Véricel E, and Guichardant M. 2015. Biological properties of a DHA-containing structured phospholipid (AceDoPC) to target the brain. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 92, 63-65.

Hachem M, Géloën A, Lo Van A, Foumaux B, Fenart L, Gosselet F, Da Silva P, Breton G, Lagarde M, Picq M, and Bernoud-Hubac N. 2015. Efficient DHA uptake by the brain from a structured phospholipid. *Molecular Neurobiology* *sous presse*.

Des communications orales suivantes:

Hachem M., Picq M., Bernoud-Hubac N and Lagarde M. Metabolic fate of AceDoPC, a stable form of LysoPC-DHA to target the brain. *Chevreul Lipids & Brain congress*. Paris, France, 16–18 March 2015.

Hachem M., Geloën A., Picq M., Lagarde M. and Bernoud-Hubac N. Docosahexaenoic acid esterified in AceDoPC is more efficiently taken up by the young rat brain than the unesterified form. *The 16th GEM- 10th GERLI lipidomics congress: from membranes to pathologies*. SaintJean Cap-Ferrat, Nice, France, 10-14 November 2013.

Hachem M., Picq M., Lagarde M. and Bernoud-Hubac N. Docosahexaenoic acid esterified in AceDoPC is more efficiently taken up by the young rat brain than the unesterified form. *The 18th congress of Doctoral School Interdisciplinary Health-Sciences (EDISS)*. Lyon, France, 3 October 2013.

Bernoud-Hubac N., Picq M., **Hachem M.**, Guichardant M., Véricel E. and Lagarde M. Biological properties of a DHA-containing structured phospholipid to target the brain. *The 11th FACS congress: PUFA for a lifetime, Goethe University*. Frankfurt, Germany, 15-17 June 2013.

Des posters suivants:

Hachem M., Géloën A., Picq M., Lagarde M. and Bernoud-Hubac N. AceDoPC as a preferred carrier form of docosahexaenoic acid to the brain. *The 14th congress of the Multidisciplinary Institute of Biochemistry of Lipids (IMBL)*. Lyon, France, 11 June 2014.

Hachem M., Picq M., Lagarde M. and Bernoud-Hubac N. Docosahexaenoic acid esterified in AceDoPC is more efficiently taken up by the young rat brain than the unesterified form. *The 13th congress of the Multidisciplinary Institute of Biochemistry of Lipids (IMBL)*. Dijon, France, 7 June 2013.

Hachem M., Picq M., Lagarde M. and Bernoud-Hubac N. Preferential transfer of acetyl-1,2-docosahexaenoyl glycerophosphocholine through an *in-vitro* model of blood-brain barrier over unesterified docosahexaenoic acid. *The 21th congress GLGL (G2L2), Hospital University of Geneva*. Geneva, Switzerland, 12 April 2013.

Hachem M., Picq M., Lagarde M. and Bernoud-Hubac N. Synthèse d'un phospholipide structuré doublement marqué (AceDoPC) et étude de son passage à travers une barrière hémato-encéphalique reconstituée *in vitro*. *12e journée scientifique de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL)*. Lyon, France, 14 mai 2012.

Hachem M., Fourmaux B., Lagarde M., Bernoud-Hubac N. and Picq M. Synthèse d'un phospholipide structuré (AceDoPC). Etude du passage de l'AceDoPC radioactif à travers une barrière hémato-encéphalique reconstituée *in vitro*. *11e journée de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL)*. Montpellier, France, 17 mai 2011.

Hachem M., Picq M., Lagarde M. and Bernoud-Hubac N. Synthèse d'un phospholipide structuré radioactif (AceDoPC) en vue de l'étude de son passage à travers une barrière hémato-encéphalique reconstituée *in vitro*. *16e journée scientifique de l'école doctorale interdisciplinaire sciences-santé (EDISS)*. Lyon, France, 24 mars 2011.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

<i>Figure 1: Structure des principaux AGPI n-3 (EPA, DHA, ALA) et n-6 (AA, AL), AGMI (AO), et AGS (AS et AP) présents dans l'alimentation humaine.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 2: Biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne.</i>	<i>38</i>
<i>Figure 3: Acides gras polyinsaturés au niveau de la rétine de l'œil.</i>	<i>43</i>
<i>Figure 4: Teneur des principaux AGPI des phospholipides des membranes du cortex cérébral.</i>	<i>44</i>
<i>Figure 5: Structures des glycérophospholipides.</i>	<i>48</i>
<i>Figure 6: Synthèse de novo de di-acyl phospholipides.....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 7: Voie métabolique de synthèse de PC.</i>	<i>50</i>
<i>Figure 8: Voie de synthèse de la PE par décarboxylation de la PS.....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 9: Cycle de dé-acylation/ré-acylation (Voie de Lands).</i>	<i>53</i>
<i>Figure 10: Remodelage des glycérophospholipides (E/C: Ethanolamine/Choline)</i>	<i>55</i>
<i>Figure 11: Action des phospholipases sur les glycérophospholipides.</i>	<i>57</i>
<i>Figure 12: Modèle pour le métabolisme de l'acide docosahexaénoïque.</i>	<i>63</i>
<i>Figure 13: Schéma de biosynthèse des principaux métabolites mono-hydroxylés du DHA.....</i>	<i>64</i>
<i>Figure 14: Schéma de biosynthèse de la protectine D1.....</i>	<i>66</i>
<i>Figure 15: Structure de PDX (isomère de PD1).....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 16: Schéma de biosynthèse de Marésine 1 (MaR1).</i>	<i>68</i>
<i>Figure 17: Schéma de biosynthèse des résolvines de la série D (RvD).....</i>	<i>70</i>
<i>Figure 18: Implication du transporteur Mfsd2a dans la captation cérébrale de la lysoPC-DHA.....</i>	<i>76</i>
<i>Figure 19: Entrée des acides gras du plasma dans le cerveau.</i>	<i>77</i>
<i>Figure 20: Unité neuro-glio-vasculaire (UNGV).</i>	<i>79</i>
<i>Figure 21: Les jonctions adhérentes et serrées au niveau des CECC.....</i>	<i>80</i>
<i>Figure 22: Les transporteurs ABC.....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 23: Structure de P-gp humain au sein de la membrane plasmique.</i>	<i>86</i>

<i>Figure 24: Forme et densité des pieds astrocytaires en contact avec le capillaire cérébral.....</i>	<i>87</i>
<i>Figure 25: Structure de la 1-acétyl,2-docosahexaénoyl-glycérophosphocholine (AceDoPC).</i>	<i>88</i>
<i>Figure 26: Effet anti-PAF de l'AceDoPC.....</i>	<i>90</i>
<i>Figure 27: Schéma de synthèse de l'$[^{14}\text{C}]$-AceDoPC.....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 28: Détermination par radiochromatographie en couche mince de la pureté radioactive de l'$[^{14}\text{C}]$-AceDoPC.</i>	<i>98</i>
<i>Figure 29: Vérification de la pureté de l'AceDoPC synthétisée par HPLC.</i>	<i>99</i>
<i>Figure 30: Analyse par MS/MS de la structure de l'AceDoPC.....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 31: Structure de la 1-palmitoyl,2-$[^{14}\text{C}]$-docosahexaénoyl-glycérophosphocholine.....</i>	<i>101</i>
<i>Figure 32: Détermination par radiochromatographie en couche mince de la pureté radioactive de la $[^{14}\text{C}]$-PC-DHA.</i>	<i>102</i>
<i>Figure 33: Modèle de co-culture de cellules endothéliales des capillaires cérébraux et de cellules gliales.</i>	<i>104</i>
<i>Figure 34: Immunofluorescence des cellules endothéliales des capillaires cérébraux et caractérisation des jonctions serrées.....</i>	<i>105</i>
<i>Figure 35: Représentation schématique de la séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) des différentes classes de lipides.</i>	<i>108</i>
<i>Figure 36: Incubation des substrats marqués dans le modèle de BHE in vitro.</i>	<i>117</i>
<i>Figure 37: Vérification de l'impact de l'incubation de l'$[^{14}\text{C}]$-AceDoPC, préalablement incubée avec du plasma, dans du DMEM à 37°C pendant 4 heures par radiochromatographie en couche mince.</i>	<i>118</i>
<i>Figure 38: Vérification de l'impact de l'incubation de la $[^{14}\text{C}]$-PC-DHA préalablement incubée avec du plasma dans du DMEM à 37°C pendant 4 heures par radiochromatographie en couche mince.</i>	<i>119</i>
<i>Figure 39: Radioactivité des lipides totaux du milieu supérieur (a) et du milieu inférieur (b).</i>	<i>121</i>
<i>Figure 40: Radioactivité des lipides totaux des cellules endothéliales et des cellules gliales.</i>	<i>123</i>
<i>Figure 41: Passage total des lipides à travers la BHE (somme de la radioactivité retrouvée dans le milieu inférieur et les cellules gliales).....</i>	<i>124</i>

<i>Figure 42: Distribution de la radioactivité parmi les classes lipidiques les plus marquées du milieu supérieur.....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 43: Distribution de la radioactivité parmi les classes lipidiques les plus marquées du milieu inférieur.</i>	<i>127</i>
<i>Figure 44: Distribution de la radioactivité parmi les classes lipidiques les plus marquées des cellules gliales.</i>	<i>129</i>
<i>Figure 45: Distribution de la radioactivité parmi les classes lipidiques les plus marquées des cellules endothéliales.</i>	<i>130</i>
<i>Figure 46: Cinétique d'incorporation du DHA dans les lipides totaux du plasma chez des rats âgés de 20 jours après injection du [¹⁴C]-AceDoPC ou de [¹⁴C]-DHA non estérifié lié au plasma.</i>	<i>134</i>
<i>Figure 47: Cinétique d'incorporation du DHA dans les lipides totaux des organes chez des rats âgés de 20 jours après injection de [¹⁴C]-AceDoPC ou de [¹⁴C]-DHA non estérifié lié au plasma.</i>	<i>136</i>
<i>Figure 48: Distribution de la radioactivité dans les différentes classes de lipides extraits des organes en fonction du temps après injection intraveineuse de [¹⁴C]-AceDoPC.....</i>	<i>138</i>
<i>Figure 49: Distribution de la radioactivité dans les différentes classes de lipides extraits des organes en fonction du temps après injection intraveineuse de [¹⁴C]-DHA.....</i>	<i>139</i>
<i>Figure 50: Comparaison de la radioactivité en ¹⁴C retrouvée dans les lipides totaux du plasma chez des rats âgés de 20 jours après injection de [¹⁴C]-AceDoPC, [¹⁴C]-PC-DHA ou [¹⁴C]-DHA lié au plasma.....</i>	<i>140</i>
<i>Figure 51: Comparaison de l'incorporation du DHA dans les lipides totaux des organes chez des rats âgés de 20 jours après injection de [¹⁴C]-AceDoPC, [¹⁴C]-PC-DHA ou [¹⁴C]-DHA lié au plasma.</i>	<i>142</i>
<i>Figure 52: Répartition du cholestérol, des triglycérides et de l'albumine dans les différentes fractions récoltées par FPLC.</i>	<i>143</i>
<i>Figure 53: Autoradiographie cérébrale du [¹⁴C]-DHA dans les différentes régions du cerveau de rat 48 heures après injection de [¹⁴C]-AceDoPC.</i>	<i>145</i>
<i>Figure 54: Modélisation moléculaire de l'AceDoPC et de la lysoPC-DHA....</i>	<i>147</i>
<i>Figure 55: Récapitulatif des études.</i>	<i>153</i>
<i>Figure 56: Schéma de synthèse de l'AceDoPC marquée au ¹³C.</i>	<i>160</i>
<i>Figure 57: Production des TG et PC marqués au ¹³C.....</i>	<i>161</i>
<i>Figure 58: Purification par HPLC préparative sur phase normale des extraits lipidiques issus de microalgues.....</i>	<i>163</i>

<i>Figure 59: Séparation des différents constituants sanguins.....</i>	<i>165</i>
<i>Figure 60: Récapitulatif de l'analyse des constituants sanguins.</i>	<i>167</i>

<i>Tableau 1: Principales sources alimentaires en AGPI.....</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 2: AGPI n-3 dans certains produits marins (g/100 g).....</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 3: Recommandations nutritionnelles conseillées en AGPI pour un adulte consommateur de 2000 Kcal.....</i>	<i>41</i>
<i>Tableau 4: Composition du tampon Tris-HCl pH 7,4.</i>	<i>111</i>
<i>Tableau 5: Coefficient de la perméabilité endothéliale du jaune Lucifer avec ou sans plasma, DHA, PC-DHA ou AceDoPC.</i>	<i>120</i>
<i>Tableau 6: Distribution de la radioactivité dans les lipoprotéines et l'albumine plasmatiques après injection de [¹⁴C]-AceDoPC ou de [¹⁴C]-PC-DHA (1mM) et sacrifice des rats 1h après l'injection.....</i>	<i>144</i>
<i>Tableau 7: Gradient d'élution utilisé en HPLC préparative pour la séparation des différentes classes de lipides.....</i>	<i>162</i>

ABREVIATIONS

AA	Acide arachidonique ou 20:4n-6
AceDoPC	1-acétyl,2-docosahexaénoyl-glycérophosphocholine
Acétyl-GPC	1-acétyl-glycérophosphocholine
AL	Acide linoléique ou 18:2n-6
ALA	Acide alpha-linolénique ou 18:3n-3
AG	Acide gras
AGL	Acide gras libre
AGMI	Acide gras monoinsaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGS	Acide gras saturé
AVC	Accident vasculaire cérébral
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BHT	Hydroxytoluène butylé
¹⁴C	Carbone 14
¹³C	Carbone 13
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDP-DG	Cytidine diphosphate diacylglycérol
CECCB	Cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins
COX	Cyclooxygénase
DG	Diglycéride

DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DHA	Acide docosaénoïque ou 22:6n-3
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
EPA	Acide eicosapentaénoïque ou 20:5n-3
EtnPlsm	Ethanolamine Plasmalogène
GC	Chromatographie gazeuse
GP	Glycérophospholipide
GPC	Glycérophosphocholine
³H	Tritium
HDL	High-Density Lipoproteins
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LCAT	Lécithine-cholestérol acyltransférase
LDL	Low-Density Lipoproteins
LE	Lipase endothéliale
LH	Lipase hépatique
LOX	Lipoxygénase
LN	Lipides neutres
LysoPC	Lysophosphatidylcholine
LysoPL	Lysophospholipide
NPD1	Neuroprotectine D1
PA	Acide phosphatidique
PBS	Phosphate buffer saline

PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
PLA₁	Phospholipase A1
PLA₂	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PG	Phosphatidylglycérol
PS	Phosphatidylsérine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SNC	Système nerveux central
TG	Triglycérides
VLDL	Very Low-Density Lipoproteins
ZO	Zonula occludens

INTRODUCTION

L'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6n-3) est un acide gras polyinsaturé oméga-3 (ω 3) ou n-3 présent de façon prépondérante dans la rétine et le cerveau (Breckenridge et al., 1972; Bazan et Scott., 1990). Cet acide gras a une origine endogène, à partir de la bioconversion de l'acide gras essentiel de la série n-3, l'acide α -linoléique (ALA, 18:3n-3) dans le foie (Gao et al., 2009) et une origine exogène, à partir d'apports alimentaires directs (Sinclair, 1975). Chez l'Homme, la biosynthèse de DHA à partir de son précurseur, ALA est très faible (Brenna et al., 2009); l'essentiel de cet acide gras doit donc être apporté par l'alimentation. Le DHA est un nutriment bioactif qui a de nombreux effets bénéfiques sur la santé. Il est notamment indispensable au développement cérébral, à l'apprentissage et à la vision (Birch et al., 2000). Il s'accumule rapidement et principalement dans le cerveau humain au cours de la période périnatale et des deux premières années de la vie. En plus de son rôle physiologique avéré au niveau cérébral, la carence en DHA pourrait être impliquée dans de nombreux désordres neurodégénératifs. Un rôle potentiel du DHA dans la prévention de plusieurs maladies du système nerveux telles que la psychose maniaco-dépressive, la dépression, l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson a été décrit (Young et al., 2005 ; Peet et Stokes, 2005 ; Gao et al., 2007). Des études récentes montrent également que le DHA a un rôle neuroprotecteur contre l'ischémie cérébrale chez le rat. Il améliore notamment les fonctions neurologiques et diminue le degré des dommages histologiques (Belayev et al., 2005 ; Belayev et al., 2009 ; Hong et al., 2014).

Dans ce contexte, le ciblage spécifique du DHA au cerveau offre des perspectives prometteuses en permettant notamment de compenser les carences observées dans les désordres neurodégénératifs. Cependant, les mécanismes par lesquels le DHA traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE) sont mal connus malgré de nombreuses études. Différentes hypothèses sont proposées dans la littérature selon la forme d'apport du DHA au cerveau (non estérifiée liée à l'albumine plasmatique ou bien estérifiée dans les lysophosphatidylcholines) (Ouellet et al., 2009 ; Chen et Subbaiah, 2007) et le mode de passage (diffusion passive ou processus de passage facilité) (Chen et al., 2008 ; Bonen et al., 2007 ; Kurtz et al., 1994).

Des études antérieures ont montré que la forme circulante du DHA influence fortement son accrétion cérébrale. Chez le rat, la lysophosphatidylcholine (lysoPC) possédant du DHA en position *sn*-2 (position physiologique du DHA dans les phospholipides cellulaires) est une forme d'apport privilégiée de DHA au cerveau (Thiès et al., 1994). Cette captation préférentielle de lysoPC-DHA comparativement au DHA non estérifié est spécifique au cerveau puisqu'elle n'est pas observée pour d'autres organes comme le cœur, le foie ou le rein qui préfèrent même la forme non estérifiée (Thiès et al., 1994). Elle est aussi spécifique des acides gras insaturés, particulièrement du DHA, qui est l'acide le mieux capté sous cette forme. Par contre, le cerveau capte de manière analogue les acides gras saturés qu'ils soient apportés sous forme non estérifiée ou estérifiée dans une lysoPC et cette captation est plus faible que celle des acides gras insaturés (Thiès et al., 1992). Des études réalisées chez l'Homme montrent l'adressage préférentiel de la lysoPC-DHA aux globules rouges (index reconnu d'accrétion cérébrale ; Fleith et Clandinin, 2005), renforçant ainsi l'hypothèse de ce véhicule privilégié pour l'accrétion du DHA au cerveau (Brossard et al., 1997 ; Lemaitre-Delaunay et al., 1999). En comparant le passage de la lysoPC-DHA et du DHA non estérifié, les deux formes étant liées à l'albumine, à travers un modèle *in vitro* de la BHE, un passage préférentiel de la forme lysoPC a été observé (Bernoud et al., 1999). Ces observations laissaient supposer qu'il pouvait exister un système de reconnaissance spécifique des lysoPC au niveau de la BHE. Plus récemment, une étude a mis en évidence le rôle critique du

transporteur orphelin Mfsd2a, exprimé au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux de la BHE, comme transporteur majeur du DHA au cerveau (Nuygen et al., 2014). Cette étude a montré que Mfsd2a transporte le DHA au cerveau spécifiquement sous forme de lysoPC-DHA.

La position physiologique du DHA dans les phospholipides cellulaires est la position *sn*-2. Or, dans le plasma humain, la 1-lyso,2-DHA-glycérophosphocholine (1-lyso,2-DHA-GPC) représente environ 50% des deux formes circulantes bien que la position la plus stable soit l'isomère 1-DHA,2-lyso-GPC. Etant donné que $\frac{3}{4}$ des DHA en position *sn*-2 migre à la position *sn*-1 en 20 min à 37°C et à pH physiologique 7,4, cela signifie que la principale forme de production est celle contenant du DHA en position *sn*-2 (Croset et al., 2000). Pour empêcher cette migration du DHA de la position *sn*-2 à la position *sn*-1 et ainsi maintenir le DHA dans sa position physiologique, nous avons acétylé la position *sn*-1 de la lysoPC-DHA. Le phospholipide structuré résultant est nommé 1-acétyl,2-docosahexaénoyl-glycérophosphocholine (AceDoPC). L'AceDoPC est considérée comme une forme stabilisée de la lysoPC-DHA ayant des propriétés d'hydrophobicités et électrostatiques voisines. Comme cela a été rapporté pour le DHA non estérifié, des effets neuroprotecteurs de l'AceDoPC ont été observés après induction d'un accident vasculaire cérébral (AVC) chez le rat (Chauveau et al., 2011).

De ces observations émanent plusieurs interrogations sur la capacité des cellules endothéliales de capillaires cérébraux à capter et à transférer le DHA estérifié sous forme d'AceDoPC par rapport à d'autres formes d'apport de DHA retrouvées naturellement dans l'alimentation (PC-DHA) ou DHA non estérifié? Le phospholipide structuré 'AceDoPC' est-il un meilleur transporteur du DHA au cerveau comparativement au DHA ou à une PC-DHA lorsqu'il est injecté dans la circulation sanguine? Dans l'affirmative, est-ce la molécule entière ou bien le DHA seul, libéré après clivage de l'AceDoPC qui est capable de passer au cerveau? Le DHA estérifié sous forme d'AceDoPC est-il réparti d'une façon homogène dans les différentes régions cérébrales?

Pour répondre à ces questions, le but de mon travail de thèse, mené au sein du laboratoire Cardiovasculaire, Métabolisme, diabétologie et Nutrition (CarMeN) a été d'étudier la biodisponibilité cérébrale du DHA en fonction de sa forme d'apport (dont l'AceDoPC) selon 3 approches :

- Sur un modèle *in vitro* de BHE.
- Chez l'animal.
- Chez l'Homme.

➤ Etudes sur un modèle *in vitro* de BHE :

Notre premier objectif a été d'analyser le passage du DHA non estérifié ou estérifié sous forme d'AceDoPC ou de PC-DHA à travers la BHE. Dans un premier temps, nous avons synthétisé l'AceDoPC et la PC-DHA acylées par du [14 C]-DHA en position *sn*-2. Afin de réaliser cette étude, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de BHE (Dehouck et al., 1990) consistant en une co-culture des deux types cellulaires, les cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins étant cultivées dans le compartiment supérieur sur un filtre et les cellules gliales dans le compartiment inférieur sur le fond d'une boîte de Pétri. Dans ces conditions, la BHE *in vitro* mime étroitement la BHE *in vivo*. Ce travail a été effectué en collaboration avec le laboratoire de physiopathologie de barrière hémato-encéphalique

(LBHE) à Lens où les cultures de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et des cellules gliales ont été réalisées.

➤ Etude chez l'animal :

Nous avons étudié chez le rat la captation cérébrale de l'AceDoPC comparativement à celle de la PC-DHA et du DHA non estérifié afin de déterminer s'il existe une incorporation cérébrale préférentielle de l'AceDoPC. Pour cela, nous avons donc étudié la biodisponibilité du DHA sous ces différentes formes dans les différents organes. Par autoradiographie cérébrale *ex vivo*, nous avons localisé le DHA apporté sous forme d'AceDoPC dans les différentes régions cérébrales, les molécules utilisées étant marquées sur les résidus acyles (par du [^{14}C]-DHA) comme pour l'étude *in vitro* de BHE. Nous avons également analysé le mode de transport utilisé pour l'AceDoPC dans le plasma (sachant que les lipides sont transportés dans le sang par l'intermédiaire de différentes lipoprotéines ainsi que par l'albumine).

➤ Etude chez l'Homme :

L'AceDoPC ainsi que le triacylglycérol-DHA (TG-DHA) et la PC-DHA marqués au ^{13}C ont été synthétisés afin d'étudier le métabolisme du DHA chez l'Homme. Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude pilote et étudié le métabolisme compartimental du ^{13}C -DHA chez trois volontaires sains ingérant chacun l'une des trois formes de DHA (TG-DHA, PC-DHA et AceDoPC). Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes (CRNH-RA). L'étude complète réalisée sur des volontaires de 60 à 70 ans, sans atteinte cognitive et ingérant chacun successivement les trois formes de DHA est toujours en cours actuellement et est présentée en annexes.

La première partie de ce mémoire, consacrée aux **Rappels bibliographiques**, comporte quatre chapitres. Le premier chapitre rapporte les données concernant les acides gras polyinsaturés et les phospholipides. Dans un deuxième chapitre, nous détaillons les connaissances acquises sur l'acide docosahexaénoïque, son métabolisme et son implication dans le fonctionnement cérébral. Puis, dans le troisième chapitre, nous décrivons les principales propriétés de la barrière hémato-encéphalique. Enfin, le dernier chapitre est consacré au phospholipide structuré à DHA : « AceDoPC ».

Le reste de ce mémoire, réservé au travail personnel, s'articule autour de cinq parties : la partie **Matériels et méthodes** ; la partie **Résultats et discussions** scindée en deux chapitres : 1) Transfert du DHA non estérifié ou estérifié (AceDoPC, PC-DHA) à travers la BHE reconstituée *in vitro* 2) Etude *in vivo* de la captation cérébrale du DHA non estérifié ou estérifié (AceDoPC, PC-DHA). L'exposé des résultats comporte un bref rappel des objectifs et des protocoles expérimentaux, ainsi qu'une discussion en fin de chapitre. Les résultats sont suivis par la partie **Conclusion générale et perspectives**. Enfin, le mémoire se termine par une **annexe et des références bibliographiques**.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I: Les acides gras polyinsaturés et les phospholipides

I.1 Les acides gras polyinsaturés (AGPI)

I.1.1 Historique et Généralités sur les acides gras

Les acides gras sont étudiés depuis presque deux siècles. En 1813, Eugène Chevreul introduit le terme d'« acide gras » et en 1823, il décrit pour la première fois certains acides gras (Chevreul, 1823).

En 1930, Burr et Burr découvrent que certains acides gras ne peuvent pas être synthétisés par les mammifères. Ces derniers sont alors appelés acides gras indispensables (Burr et Burr, 1930).

Bloch et Lynen découvrent le mécanisme de régulation du cholestérol et le métabolisme des acides gras et ils obtiennent le prix Nobel de Médecine en 1964 (Bloch et Lynen, 1964). Un deuxième prix Nobel de Médecine est attribué à Bergström et al. en 1982 pour leurs découvertes concernant les prostaglandines et les substances actives associées dérivées des acides gras.

Les acides gras (AG) sont des molécules possédant une chaîne hydrocarbonée ayant une fonction acide carboxylique à une extrémité. Le nombre d'atomes de carbone dans les graisses animales et les huiles végétales est généralement compris entre 12 et 22 ; ils sont numérotés à partir du groupement carboxylique et le dernier atome de carbone est noté ω ou n. Les AG sont classés selon le nombre d'atomes de carbone: court (<8), moyen (8 à 12), long (14 à 18) ou très long (≥ 20). Les AG peuvent être saturés (AGS, tels que l'acide palmitique ou stéarique), mono- (AGMI, comme l'acide oléique) ou poly-insaturés (AGPI, comme l'acide docosahexaénoïque) selon qu'ils possèdent une ou plusieurs doubles liaisons.

Les acides gras insaturés (AGI) appartiennent à quatre familles distinctes : n-9, n-7, n-6, n-3. Elles sont ainsi appelées car la double liaison la plus proche du méthyl terminal est portée par le 9^{ème} (n-9) ou le 3^{ème} carbone (n-3), par exemple, à partir de cette extrémité. Elles dérivent respectivement de l'acide oléique (AO, 18:1n-9), de l'acide palmitoléique (16:1n-7), de l'acide linoléique (AL, 18:2n-6) et de l'acide alpha-linolénique (ALA, 18:3n-3). Les doubles liaisons sont généralement en configuration cis (ou Z). Des doubles liaisons trans se retrouvent rarement dans la nature. Ces caractéristiques physiques ont des effets importants sur leurs propriétés fonctionnelles. Plus l'insaturation est élevée, plus la température de fusion de l'acide gras est basse. A température ambiante, les acides gras trans sont solides alors que la molécule équivalente où les acides gras sont cis est liquide.

La structure principale des AGS, AGMI et AGPI présents dans l'alimentation humaine est illustrée dans la figure 1.

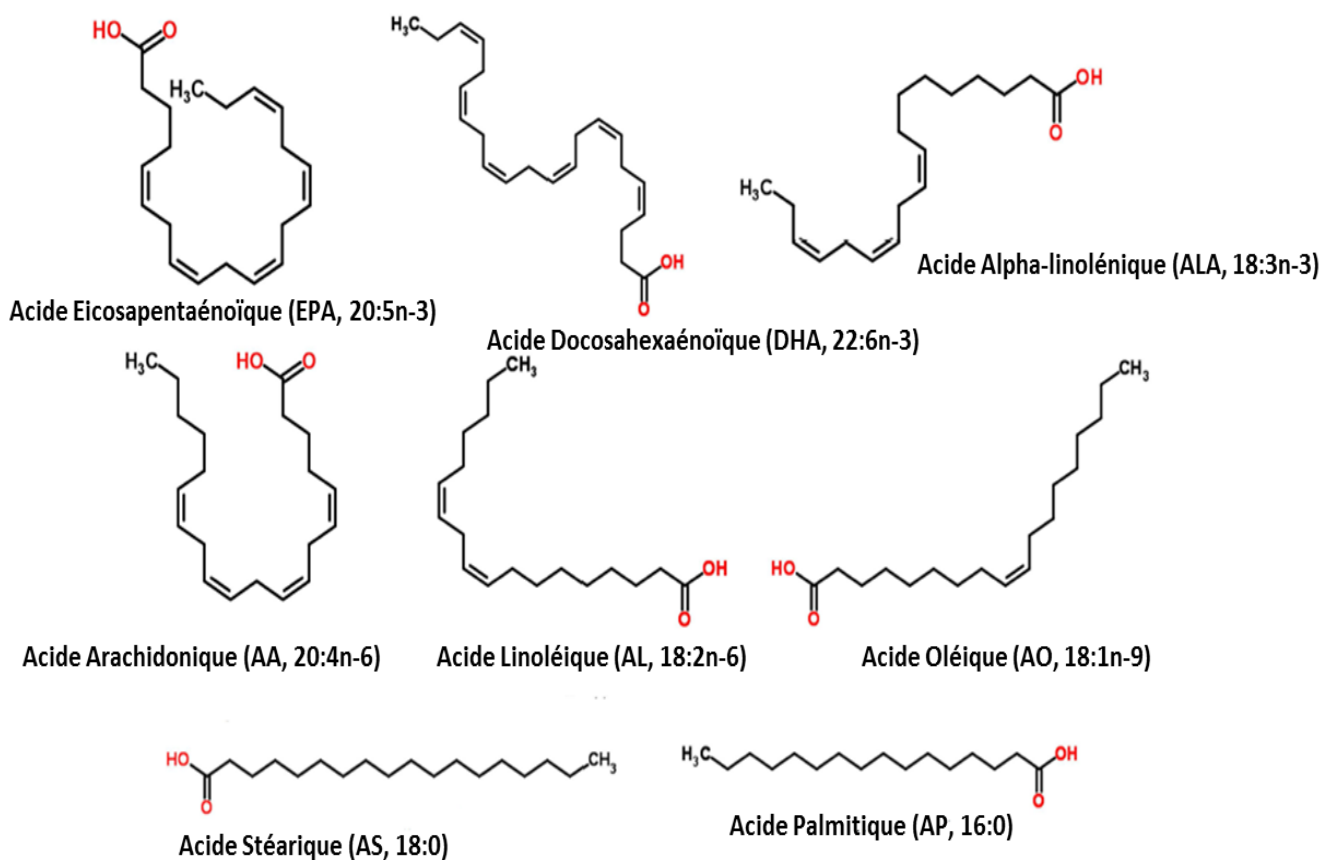


Figure 1: Structure des principaux AGPI n-3 (EPA, DHA, ALA) et n-6 (AA, AL), AGMI (AO), et AGS (AS et AP) présents dans l'alimentation humaine.

(d'après Moreno et al., 2012)

I.1.2 Biosynthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI)

AL et ALA sont des acides gras indispensables car ils doivent être apportés par l'alimentation. Comme leur carence induit des troubles métaboliques importants, ils sont aussi appelés acides gras essentiels. Beaucoup d'huiles alimentaires d'origine végétale telles que l'huile de tournesol et l'huile d'arachide sont riches en AL tandis que les huiles de poisson, les huiles de colza, de noix et de soja sont riches en ALA.

La synthèse des AGPI se fait à partir de ces précurseurs par une série de réactions de désaturation (élimination de deux atomes d'hydrogène entre deux carbones adjacents créant ainsi une double liaison) et d'élongation (addition de deux atomes de carbone) catalysées par des enzymes. L'essentiel des réactions a lieu au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique dans le foie. Les AG des séries n-6 et n-3 utilisent les mêmes systèmes enzymatiques et peuvent aussi entrer en compétition (Sprecher, 1981).

Dans le cas de la série n-6, l'AL est notamment converti en acide arachidonique (AA, 20:4n-6), acide gras présent de façon ubiquiste dans les tissus et jouant un rôle important dans l'hémostase en tant que précurseur des eicosanoïdes.

Dans le cas de la série n-3, l'ALA est converti en acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3) et en acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6n-3). Le DHA est majoritaire dans le cerveau, la rétine, les testicules et le sperme (Bourre et al., 1984 ; Connor et al., 1998).

La représentation schématique de la voie de formation des AGPI a subi un certain nombre de changements au fil des ans. Elle se décrit actuellement selon la figure 2.

Le DHA est synthétisé à partir de l'ALA par addition d'une double liaison par une $\Delta 6$ -désaturase pour former l'acide stéaridonique (SDA, 18:4n-3). L'allongement de SDA forme l'acide eicosatétraénoïque (ETA, 20:4n-3). Ensuite, une autre double liaison est ajoutée par une $\Delta 5$ -désaturase pour former l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3).

Chez les eucaryotes inférieurs, cette étape est suivie par l'allongement de l'EPA pour former l'acide docosapentaénoïque (DPA, 22:5n-3) et par formation finale d'une double liaison par la $\Delta 4$ -désaturase pour conduire au DHA. Tandis que chez les mammifères, l'EPA est allongé en DPA qui est ensuite allongé en acide tétracosapentaénoïque (TPA, 24:5n-3); une double liaison est ensuite formée par une $\Delta 6$ -désaturase ce qui conduit à l'acide tétracosahexaénoïque (THA, 24:6n-3), et le THA est bêta-oxydé en DHA dans les peroxysomes (Leonard et al., 2004).

Les AGPI n-6 et n-3 peuvent également provenir de l'alimentation. Ainsi, la viande ou les œufs sont riches en AA, alors que le DHA et l'EPA sont présents dans les poissons gras (saumon, thon, sardine...).

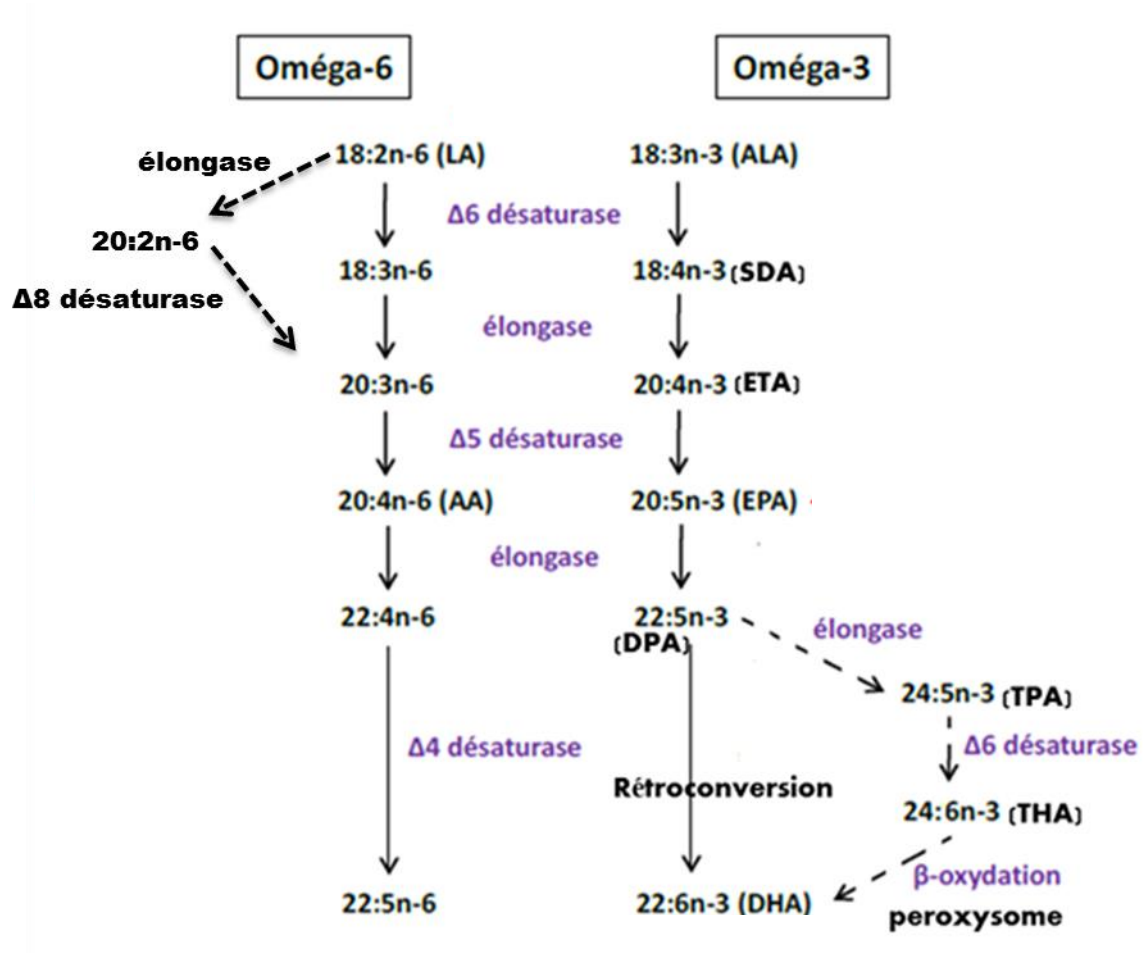


Figure 2: Biosynthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne.

Les acides gras polyinsaturés sont synthétisés par une combinaison de réactions d'élongation (addition de deux atomes de carbone par les élongases) et de désaturation (élimination de deux atomes d'hydrogène entre deux carbones adjacents créant ainsi une double liaison par action des désaturases).

Dans le cerveau:

L'AA et le DHA sont des constituants fondamentaux des phospholipides des membranes cellulaires. Bien que la majorité du DHA présent dans les membranes cérébrales provienne du plasma (Spector, 2001), de nombreuses études ont montré que le cerveau est capable de le synthétiser à partir de son précurseur, l'ALA (Moore et al., 1990). Néanmoins, toutes les études s'accordent pour reconnaître que la conversion de l'ALA en DHA est très faible, entre 0,02% et 4% et que cette conversion n'est pas augmentée lors d'un régime déprivé en AGPI n-3 (Emken et al., 1994 ; Pawlosky et al., 2001 ; Burdge et Wootton, 2002). Cette capacité de synthèse varie en fonction de l'âge et évolue différemment selon l'espèce considérée.

De nombreuses études *in vivo* ont utilisé des traceurs isotopiques pour mesurer l'efficacité de cette conversion. Chez le rat, seulement 0,2% de la dose du [¹⁴C]-ALA injectée par voie intraveineuse est convertie en DHA au niveau cérébral, la plus grande partie étant rapidement (5min) dégradée *in situ* par voie oxydative (Rapoport et al., 2007). Selon ces travaux, le DHA cérébral proviendrait exclusivement du DHA produit par le foie, libéré dans la circulation sanguine puis capté à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) par le cerveau. Des travaux publiés par Rapoport et al. (2010), montrent que la quantité de DHA néosynthétisé par le cerveau suite à un bolus d'ALA radiomarké est largement inférieure à la quantité requise par l'ensemble des cellules nerveuses (0,002μmole vs 0,3μmole/jour).

Des études métaboliques de conversion de l'AL en AA ont montré chez le rat en croissance que seulement 3% de l'AL consommé étaient convertis en AA, plus de 75% étant β-oxydés et 20% étant accumulés dans les triglycérides de réserve (Cunnane et Anderson, 1997).

En plus des études *in vivo* de conversion des AGPI, des études *in vitro* ont été réalisées sur des cellules cérébrales isolées et ont montré que les éléments neuronaux et gliaux pouvaient désaturer et allonger l'AL et l'ALA (Yavin et Menkes, 1974 ; Cohen et Bernsohn, 1978). D'autres travaux ont montré que les oligodendrocytes et les cellules gliomales C₆ (astrocytes néoplasiques) ne formaient ni AA ni DHA (Fewster et al., 1975 ; Robert et al., 1977), alors que des cultures de cellules d'origine neuronale, les rétinoblastomes humains, pouvaient produire ces deux acides gras (Yorek et al., 1985). Il a donc été considéré que les neurones, et non la glie, étaient responsables de la formation des AGPI dans le cerveau. Cependant, d'autres auteurs ont décrit que les astrocytes étaient le site principal de synthèse du DHA (Moore et al., 1991 ; Williard et al., 2001).

Delton-Vandenbroucke et al. (1997) ont mis en évidence la formation du DHA en incubant des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales et rétinienne de rat avec du [¹⁴C]-22:5n-3. En plus, Bernoud et al. (1998) ont montré que les cellules endothéliales sont capables de synthétiser le DHA à partir de l'ALA et ceci en utilisant un modèle *in vitro* de la BHE. Plus spécifiquement, Selivonchick et Roots (1977) montrent que les cellules endothéliales de capillaires cérébraux sont riches en AL et ALA et Benistant et al. (1995) ont mis en évidence que ces concentrations augmentent lorsque les cellules endothéliales sont cultivées en présence d'astrocytes. Bien que les astrocytes et les cellules endothéliales puissent convertir l'ALA en DHA, la capacité du cerveau à réaliser cette conversion *in vivo* reste controversée.

L'ensemble de ces données suggère que les acides gras essentiels (ALA et AL) constituent une source alimentaire limitée pour satisfaire la totalité des besoins en DHA et en AA des tissus humains et notamment ceux du système nerveux central.

I.1.3 Sources et recommandations en AGPI

Les principaux AGPI (n-3 et n-6) trouvés dans l'alimentation et leurs sources alimentaires sont présentés dans le tableau 1.

Nomenclature physiologique	Nom usuel	Source alimentaire typique
C18:2 n-6	Acide linoléique (AL)	la plupart des huiles végétales, le jaune d'œufs
C18:3 n-3	Acide α -linolénique (ALA)	l'huile de lin, de périlla, de colza, de noix et de soja
C18:3 n-6	Acide γ -linolénique (GLA)	l'huile d'onagre, de bourache, et de pépin de cassis
C18:4 n-3	Acide stéaridonique (SA)	poisson, l'huile de soja modifié génétiquement, de graine de cassis, de chanvre
C20:4 n-6	Acide arachidonique (ARA)	graisses animales, foie, œufs et poisson
C20:5 n-3	Acide éicosapentaénoïque (EPA)	poisson, notamment des poissons gras (saumon, hareng, anchois, l'éperlan et maquereau)
C22:5 n-6	Acide docosapentaénoïque (n-6 DPA)	très peu présent dans les tissus animaux
C22:5 n-3	Acide docosapentaénoïque (n-3 DPA)	poisson, notamment des poissons gras (saumon, hareng, anchois, l'éperlan et maquereau)
C22:6 n-3	Acide docosahexaénoïque (DHA)	poisson, notamment des poissons gras (saumon, hareng, anchois, l'éperlan et maquereau)

Tableau 1: *Principales sources alimentaires en AGPI*

(Thèse Du.Q., 2010).

La Société européenne en cardiologie recommande de manger du poisson au moins deux fois par semaine pour la prévention des maladies cardiovasculaires. Les concentrations des deux principaux AGPI n-3 (EPA et DHA) dans certains produits marins (saumon, anchois...) sont présentés dans le tableau 2. Par exemple, 100 g de saumon contiennent 1,95 g d'EPA et de DHA.

Product	EPA	DHA	EPA + DHA
Salmon	1.008	0.944	1.952
Herring	0.709	0.862	1.571
Anchovy	0.538	0.911	1.449
Mackerel	0.329	1.012	1.341
Swordfish	0.108	0.531	0.639
Sea bass	0.161	0.434	0.595
Mussel	0.146	0.342	0.488
Squid	0.188	0.253	0.441
Soil	0.093	0.106	0.199
Cod	0.064	0.120	0.184

Tableau 2: *AGPI n-3 dans certains produits marins (g/100 g).*

(Marangoni et Poli, 2013)

Récemment, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a réactualisé les apports nutritionnels conseillés (ANC) en lipides qu'elle avait établis en 2001 pour mieux prévenir certaines pathologies telles que le syndrome métabolique, le diabète, l'obésité, les maladies cardiovasculaires et le cancer. Ainsi, pour prévenir ces pathologies, la part recommandée des lipides dans l'apport énergétique total (AET) chez l'adulte est de 35 à 40%. L'ANSES apporte également de nouvelles recommandations pour la part des AGPI indispensables ou non. L'ANC de l'AL a été fixé à 4% de l'apport énergétique, alors que celui de l'ALA a été fixé à 1% de l'AET avec un rapport n-6/n-3 conseillé inférieur à 5. Des ANC ont également été fixés pour les AGPI à longue chaîne de la série oméga 3 : 250 mg par jour pour le DHA, soit deux fois plus qu'en 2001 et 250 mg par jour pour l'EPA (AFSSA 2010) (Tableau 3).

Recommandations nutritionnelles conseillées en AGPI	
Acide linoléique (AL)	4 % de l'AE soit 8,8 g/j
Acide α -linolénique (ALA)	1 % de l'AE soit 2,25 g/j
Acide docosahexaénoïque (DHA)	0,113 % de l'AE soit 250 mg/j
Acide eicosapentaénoïque (EPA)	0,113 % de l'AE soit 250 mg/j

Tableau 3: *Recommandations nutritionnelles conseillées en AGPI pour un adulte consommateur de 2000 Kcal. (AFSSA 2010)*

Les AGPI à longue chaîne des séries oméga 3 et 6 participent à une multitude de processus physiologiques, autres qu'énergétiques. Il est important de différencier les AGPI des deux familles n-3 et n- 6. En effet, les mécanismes d'action sont différents et donc leurs cibles dans le corps humain diffèrent également. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux AGPI n-3 dont les recherches se sont accrues depuis la découverte de leurs actions préventives et thérapeutiques sur de nombreuses pathologies il y a une trentaine d'années. Nous dénombrons des études à la fois expérimentales et cliniques montrant les bienfaits de ces acides gras.

I.2 Rôles physiologiques des AGPI n-3

Les données de la littérature concernant les effets physiologiques des AGPI n-3 sont très nombreuses. Des centaines d'études concernent l'effet des AGPI n-3 sur la prévention des maladies cardiovasculaires mais des études plus récentes montrent qu'ils auraient également des effets protecteurs dans les cancers (notamment les cancers du sein et du colon). Ils interviendraient aussi dans la prévention et le traitement des diabètes de type 2 et surtout au niveau de la vision et du développement cérébral. Les paragraphes suivants reprennent quelques exemples de ces effets bénéfiques.

I.2.1.1 AGPI n-3 et systèmes cardiovasculaires

Un intérêt considérable pour les AGPI n-3, notamment le DHA et l'EPA, est apparu en 1979 quand des études épidémiologiques réalisées par Dyerberg et Bang ont montré chez les Esquimaux vivant au Groenland une relation inverse entre l'incidence des maladies cardiovasculaires et la consommation de poissons gras (2,1 g EPA + DHA / j) (Dyerberg et Bang, 1979).

Depuis lors, un grand nombre d'études épidémiologiques ont mis en évidence un lien entre les AGPI n-3 et la protection des maladies cardiovasculaires. L'effet thérapeutique pourrait être dû à une diminution des facteurs de risque notamment la prévention de l'arythmie, la diminution des triglycérides plasmatiques, la diminution de la pression sanguine, la diminution de l'agrégation plaquettaire et de l'inflammation (Jump et al., 2012 ; Marchioli et Levantesi, 2013 ; Marangoni et Poli, 2013).

Nous citerons certaines de ces études ci-dessous :

- L'étude Diet and Reinfarction Trial (DART) a montré une réduction (29%) de la mortalité chez les hommes qui ont survécu à un infarctus du myocarde et qui avaient consommé du poisson en parallèle (plus de deux fois par semaine) avec un apport de 500 à 800 mg / jour d'AGPI n-3 (Burr et al., 1989) et ceci en comparaison avec des hommes ayant survécu à un infarctus mais n'ayant pas consommé du poisson.

- Le Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico (GISSI) est un essai contrôlé randomisé qui a testé l'efficacité de l'administration par voie orale de 1 g par jour d'AGPI n-3 (EPA + DHA: rapport 1/2) et de vitamine E sur la mortalité chez 11 323 patients italiens ayant un infarctus du myocarde. Après 3,5 ans de suivi, le traitement aux AGPI n-3 a réduit significativement la mortalité cardiaque avec le plus grand bénéfice dans les 9 premiers mois après l'infarctus du myocarde (Marchioli et al., 2002).

- Le Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS) est un essai mené avec 18 000 patients Japonais hypercholestérolémiques traités avec une statine en association avec un régime riche en AGPI n-3 (EPA: 1,8 g / jour) ou traités avec une statine seule. Après 4,6 ans, les patients dont le traitement hypocholestérolémiant a été associé à une alimentation enrichie en AGPI n-3 ont montré une réduction de 19% de maladie coronarienne (Yokoyama et al., 2007).

Il est à noter que ces études utilisent généralement une combinaison d'AGPI n-3, spécialement DHA+EPA. Il est difficile de discerner les rôles spécifiques de chacun de ces AG. Des études cliniques pourraient être envisagées pour déterminer si l'effet bénéfique est dû à l'EPA, au DHA, ou à la combinaison des deux. Une seule étude rapportant les résultats concernant une supplémentation en DHA seul chez des patients hypertriglycéridémiques pendant 45 jours a montré une diminution de la concentration en triglycérides et en

lipoprotéines de faible densité (LDL, Low-Density Lipoproteins) (Kelley et al., 2007). Il est également important de connaître quel dosage est efficace puisque celui-ci semble varier selon la pathologie.

I.2.1.2 AGPI n-3 et vision

Le DHA est présent en quantité importante dans la rétine (SanGiovanni et Chew, 2005). Les cellules photoréceptrices de la rétine contiennent jusqu'à 30% d'AGPI n-3 (DHA) et des quantités moins importantes d'EPA et de DPA (figure 3).

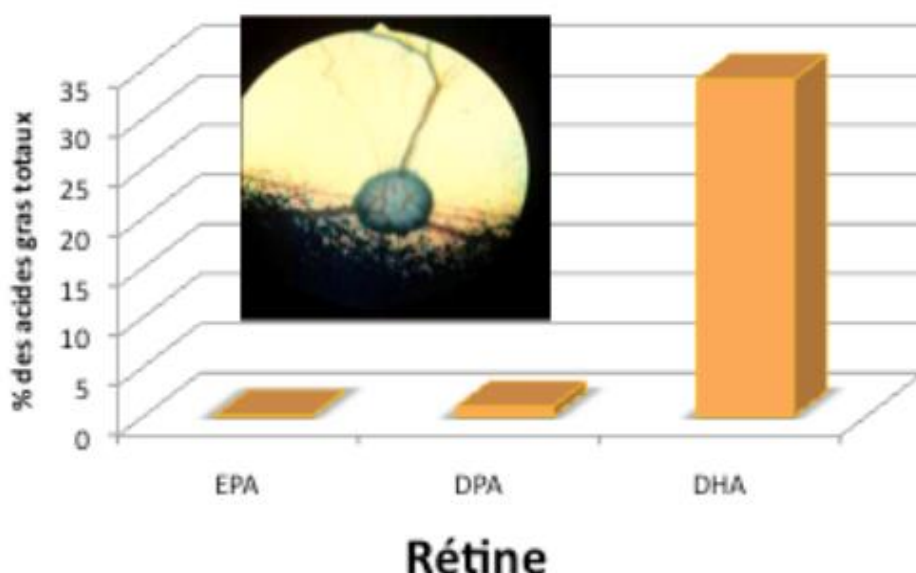


Figure 3: Acides gras polyinsaturés au niveau de la rétine de l'œil.

(d'après Martinot S, 2010)

Le DHA joue un rôle primordial dans la vision. Il est concentré dans les segments externes des photorécepteurs (Bazan et Scott, 1990). Cette incorporation assure la fluidité et la flexibilité optimale de la membrane cellulaire et est indispensable au bon fonctionnement de la rétine.

Plusieurs études ont montré qu'une supplémentation en oméga-3 durant les premiers mois de la vie peut améliorer l'acuité visuelle chez les enfants prématurés (O'Connor et al., 2001). Il a également été décrit que des supplémentations en DHA des mères durant la grossesse favorisent le développement visuel et cognitif des nouveau-nés (Belkind-Gerson et al., 2008). Une déficience en oméga-3, et plus spécifiquement en DHA, durant le développement natal, altère au contraire les fonctions visuelles (Innis, 2000 ; Catalan et al., 2002).

Par ailleurs, chez l'Homme, dans les cas de rétinopathie pigmentaire, une maladie dégénérative rétinienne provoquant une perte des bâtonnets de la rétine, le taux sanguin de DHA est abaissé par rapport aux sujets contrôles (Hoffman et Birch, 1995). De même, le contenu en DHA dans les phospholipides de rétines de chiens affectés de dégénérescence rétinienne, maladie similaire à la rétinopathie pigmentaire humaine, diminue significativement (Anderson et al., 1991). Ces chiens présentent aussi des niveaux plus faibles de DHA dans les segments externes des bâtonnets de la rétine.

En outre, le DHA et ses métabolites bioactifs tels que la neuroprotectine (NPD1) sont des inhibiteurs efficaces de la mort cellulaire, de l'inflammation et ont un rôle protecteur contre

l'incidence de la dégénérescence maculaire avancée liée à l'âge (DMLA) (Bazan et al., 2011). Une autre étude décrit le lien entre la consommation de DHA et la diminution du risque de développer un glaucome (Creuzot-Garcher et Bron, 2008).

Toutes ces études concluent donc sur le rôle essentiel des AGPI n-3 dans le développement rétinien et les fonctions visuelles.

I.2.1.3 AGPI n-3 et fonctionnement cérébral

Après le tissu adipeux, le cerveau est l'organe le plus riche en lipides. En effet, les lipides constituent 50 à 60% de son poids sec (Sastry, 1985), principalement sous la forme de phospholipides (PL). Ces PL se distinguent par leur richesse en AGPI et plus particulièrement en AA et en DHA (Alessandri et al., 2004). L'EPA est présent en faible quantité (concentration 200-500 fois plus faible que le DHA car l'EPA est rapidement β -oxydé) (Bazinet et Layé, 2014). Le DHA et l'AA représentent notamment 25% et 15%, respectivement, des acides gras totaux du cortex cérébral (figure 4).

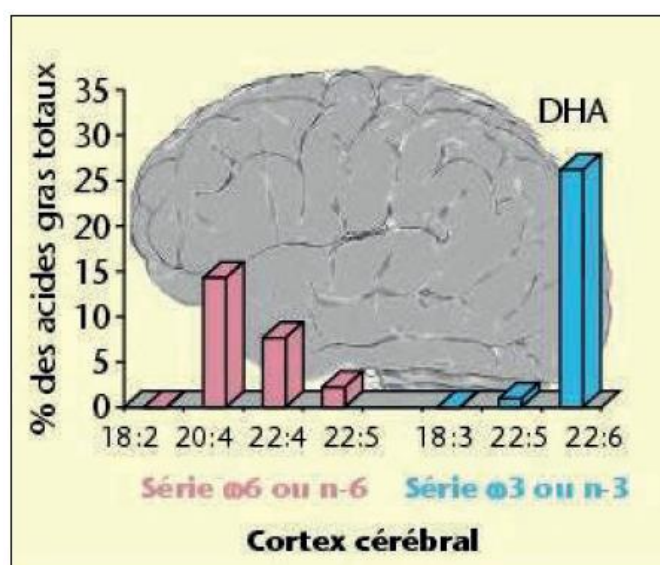


Figure 4: Teneur des principaux AGPI des phospholipides des membranes du cortex cérébral.

(Tinoco, 1982)

Dans les neurones et les astrocytes, la quantité d'AGPI représente environ 30% des acides gras contenus dans les lipides totaux, avec plus d'AA que de DHA dans les neurones (15 vs 8%) et une même proportion est observée dans les astrocytes (environ 10%) (Bourre et al., 1995).

Depuis de nombreuses années, le rôle des AGPI n-3, principalement le DHA, a été bien établi dans le développement cérébral et neurologique. La captation et l'accumulation du DHA dans le cerveau ont lieu durant la période de développement cérébral précédant la myélinisation. Chez le rat, cela se produit entre la naissance et le 20^{ème} jour postnatal (Sinclair et Crawford, 1972). Chez l'Homme, l'accrétion cérébrale du DHA commence lors de la croissance fœtale, augmente lors du dernier trimestre de la gestation et se poursuit au cours des 12 premières semaines postnatales (Clandinin et al., 1980 a,b).

Le DHA est essentiel pour le maintien structural et fonctionnel du cerveau. Sa concentration dépend de la teneur en DHA alimentaire ainsi que de sa synthèse hépatique à partir de son

précurseur ALA (Gao et al., 2009). Mais comme décrit précédemment, cette conversion est limitée chez l'Homme (Brenna et al., 2009).

Différents mécanismes ont été décrits expliquant les effets bénéfiques des AGPI n-3 dans le système nerveux central.

Le DHA est particulièrement impliqué dans le maintien de la fluidité membranaire des neurones et la survie cellulaire (Green et al., 2008 ; Wurtman, 2008). Il agit également comme un second messenger *via* les neurorécepteurs et peut être converti en diverses molécules de signalisation dont certaines possèdent des propriétés anti-inflammatoires puissantes (Schwab et al., 2007). De plus, le DHA peut modifier l'activité des récepteurs, des canaux ioniques, des protéines G et d'autres protéines liées aux membranes. Il différencie les cellules souches neuronales, active la syntaxine 3 qui est une protéine membranaire synaptique favorisant l'allongement des neurites et diminue le contenu en AA des phospholipides. En outre, le DHA augmente la synthèse des membranes synaptiques et les quantités de protéines spécifiques pré- et post-synaptiques (Wurtman, 2008).

Le DHA joue aussi un rôle au niveau du stress oxydant. Le cerveau est particulièrement sensible au stress oxydant vu son contenu élevé en AGPI (AA et DHA) facilement oxydables et parce que la fonction mitochondriale nécessaire aux besoins énergétiques du cerveau consomme beaucoup de glucose, un processus associé à une forte production de radicaux libres. L'administration de DHA exerce un effet anti-oxydant en augmentant l'activité glutathion réductase et en diminuant l'accumulation de peroxydes lipidiques et espèces oxygénées réactives dans le cortex et l'hippocampe de modèles de rat Alzheimer. Les études sur l'impact d'une supplémentation en DHA sur le stress oxydant ont conduit à des résultats contradictoires par le fait que les quantités utilisées étaient très variables d'une étude à l'autre. Ces études ont mis en évidence le fait que la supplémentation avec de fortes doses de DHA pourraient favoriser la peroxydation lipidique alors que de faibles doses de DHA pourraient être protectrices (Lagarde M, 2008).

Des études montrent qu'une déficience en DHA peut altérer différents paramètres cérébraux. D'après une étude réalisée en 1986, il semble qu'une déficience en DHA pendant le développement embryonnaire provoque des perturbations du comportement et de l'apprentissage (Neuringer et al., 1986). Ceci a été confirmé plus tard par de nombreuses études expérimentales qui ont démontré qu'une déficience en AGPI n-3 était associée à des perturbations du fonctionnement cérébral, avec des conséquences sur certains types de comportements (Fedorova et Salem, 2006).

En effet, la déficience en DHA dans le cerveau affecte la neurotransmission, les activités d'enzymes membranaires et de canaux ioniques menant à des problèmes comportementaux (dépression, troubles de l'humeur), à des difficultés d'apprentissage et à des maladies neurodégénératives (Scott et Bazan, 1989 ; Bazan, 2003). Parallèlement, Rapoport et al. (2007) ont montré que la déficience en DHA plasmatique par diminution de son apport nutritif provoque l'augmentation de sa synthèse à partir de son précurseur, l'ALA dans le foie. Par contre, lors d'une carence en DHA et en ALA, le foie synthétise davantage d'acide docosapentaénoïque (DPA, 22:5n-6), un métabolite de l'AA et celui-ci va remplacer le DHA dans les phospholipides cérébraux. Cela peut alors entraîner des pathologies nerveuses. Inversement, l'adjonction de DHA dans le régime alimentaire augmente les capacités d'apprentissage.

Outre l'implication du DHA dans le fonctionnement cérébral, de nombreuses études ont souligné ses effets neuroprotecteurs. Les effets neuroprotecteurs du DHA seront détaillés dans le chapitre 2.

I.3 Les phospholipides

Nous rappellerons dans cette partie les principales voies de synthèse des phospholipides (PL) constitutifs des diverses membranes cellulaires en nous cantonnant aux seuls glycérophospholipides (GP) puisqu'ils renferment la quasi-totalité des AGPI.

I.3.1 Classification des glycérophospholipides

Les glycérophospholipides (GP) sont des éléments structuraux et fonctionnels importants des membranes biologiques puisqu'ils représentent 80% des lipides membranaires. Ils contiennent des AG en positions *sn-1* et *sn-2* d'un squelette glycérol ainsi qu'un groupement phosphate en position *sn-3* sur lequel est estérifiée une tête polaire. Les GP sont des molécules amphiphiles, le groupement phosphate ainsi que la tête polaire constituant la partie hydrophile alors que les chaînes acyles et le glycérol forment la partie hydrophobe. Concernant les AG, si la position *sn-1* est souvent occupée par un acide gras saturé tel que l'acide stéarique, on trouve en position *sn-2* un acide gras insaturé, en particulier le DHA ou l'AA. La composition en AG des GP est un des facteurs qui influencent la fluidité membranaire. Plus les chaînes carbonées des AG sont courtes et insaturées, plus la membrane est fluide.

Dans chaque tissu, les membranes cellulaires contiennent une composition distincte en différents GP. Via la voie *de novo*, différents types de GP avec différentes têtes polaires en position *sn-3* du glycérol, tels que l'acide phosphatidique (PA), la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylglycérol (PG) et le phosphatidylinositol (PI) sont générés (Hishikawa et al., 2014). La figure 5 représente les principaux types de GP.

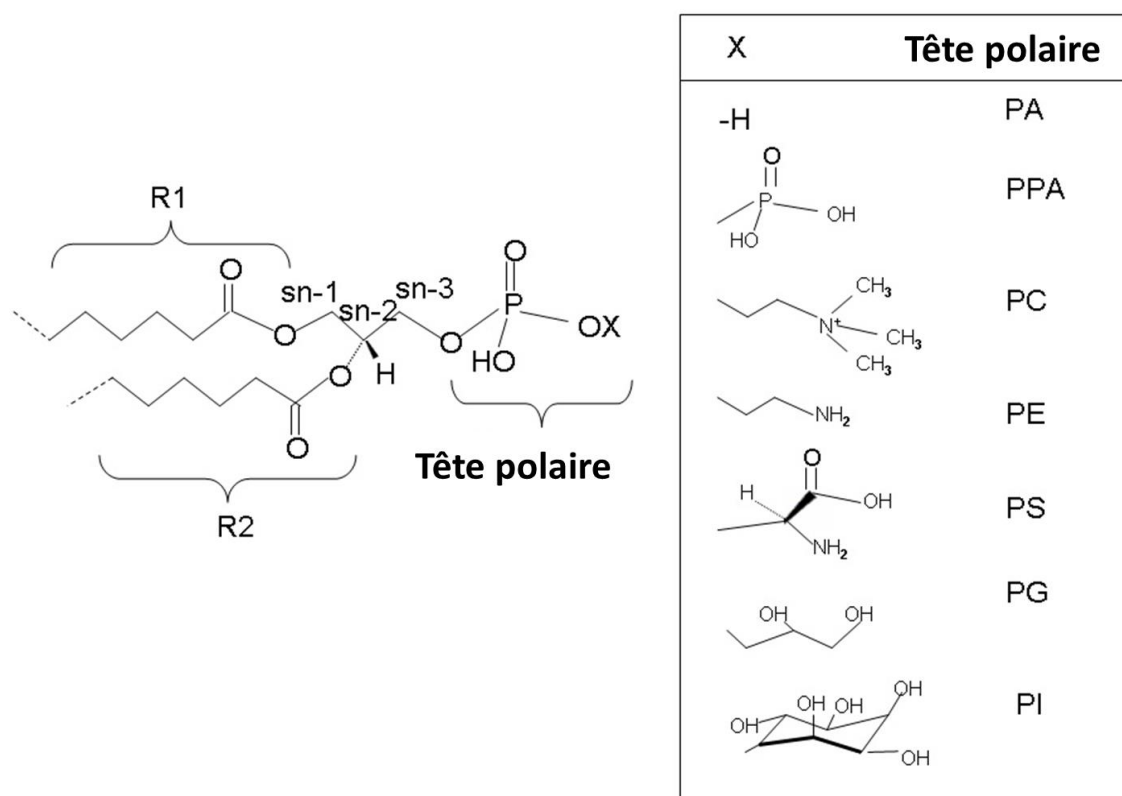


Figure 5: Structures des glycérophospholipides.

R1, R2 et X sont des variables en position *sn-1*, *sn-2* et *sn-3* respectivement: PA = phosphate, PPA = pyrophosphate, PE = phosphatidyléthanolamine, PC = phosphatidylcholine, PS = phosphatidylsérine, PG = phosphoglycérol, et PI = phosphoinositol (d'après Yetukuri et al., 2007).

En plus des GP cités ci-haut, les plasmalogènes constituent une classe particulière de GP membranaires ayant une caractéristique structurale unique : un groupe éther vinylique, $-O-CH=CH-$, sur la position *sn-1* du glycérol au lieu de la fonction ester habituelle. Les AG (C16:0, C18:0 et C18:1) sont majoritaires en position *sn-1* du glycérol tandis que la composition en AG en position *sn-2* dépend des tissus. Dans les neurones, les plasmalogènes riches en AGPI (AA et DHA) sont les plus abondants. Minoritaires dans des organes comme le foie ou le rein, les plasmalogènes sont, en revanche, abondants dans le myocarde et le cerveau. Les plasmalogènes à éthanolamine (EtnPlsm) représentent 40-60% des PE du cerveau (Diagne et al., 1984).

I.3.2 Biosynthèse des glycérophospholipides

Kennedy et Weiss étaient les premiers à décrire la biosynthèse des GP ou synthèse '*de novo*' en 1956. La synthèse '*de novo*' des PL débute par la synthèse de sn-glycérol-3-phosphate, formé majoritairement par la réduction de la dihydroxyacétone phosphate ou bien de façon minoritaire par phosphorylation du glycérol.

L'acide phosphatidique est formé à partir du sn-glycérol-3-phosphate par acylation grâce à l'action d'une sn-glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPATs) et en présence d'un acyl-CoA aboutissant à la formation de l'acide lysophosphatidique suivie d'une seconde acylation (figure 6). L'acide phosphatidique est l'intermédiaire commun à la synthèse de tous les PL. Il est transformé en sn-1,2-diacylglycérol (DG) par une phosphatase acide phosphatidique en libérant un groupement phosphate (Pi). Le DG formé est le précurseur des PC et des PE. De même, les PI et les PG sont synthétisés à partir de l'acide phosphatidique. Nous détaillons dans les parties suivantes les mécanismes de biosynthèse de ces différents PL ainsi que les principales voies métaboliques cérébrales impliquées.

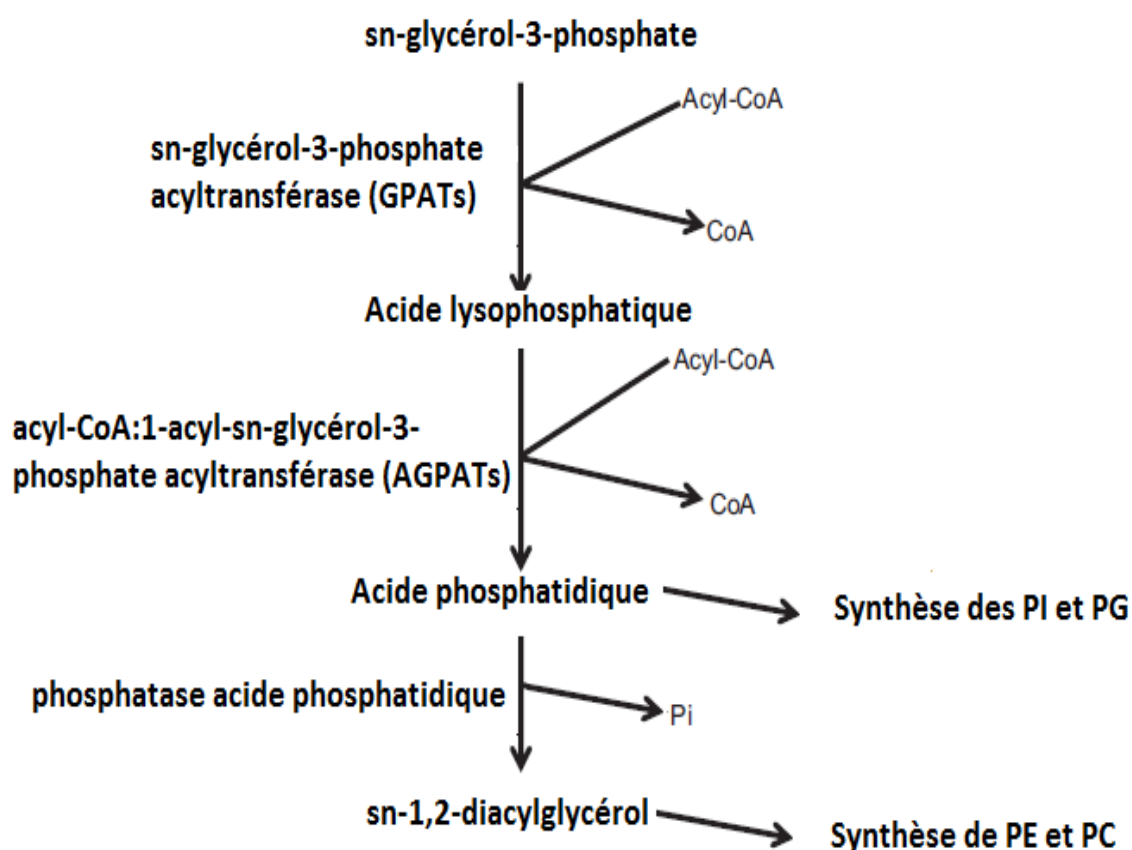


Figure 6: Synthèse de novo de di-acyl phospholipides.

(d'après Kitson et al., 2012)

I.3.2.1 Biosynthèse des phosphatidylcholines

La PC est l'un des PL majoritaire (35 à 50%) dans les membranes cellulaires et est synthétisée majoritairement dans l'appareil de Golgi et dans les mitochondries (Bishop et Bell, 1988). Elle est davantage localisée dans le feuillet externe de la membrane plasmique.

La principale voie de synthèse de la PC se fait à partir de la choline *via* la voie de Kennedy ou la voie cytidine diphosphate-choline (CDP-choline) (Dennis et Kennedy, 1972). Il existe une autre voie de biosynthèse de la PC à partir de la PE suite à 3 méthylations successives.

Des études antérieures ont montré que la nature des AG estérifiés en position *sn-1* et *sn-2* des PC influencent l'une ou l'autre des voies de synthèse. La voie de synthèse CDP-choline est favorisée lorsque les acides gras sont saturés à chaîne moyenne. Dans le cas des acides gras à chaînes longues et polyinsaturés (ex : DHA, AA, EPA), la voie de méthylation de PE est privilégiée (DeLong et al., 1999). Concernant cette voie de synthèse, la choline pénètre dans un premier temps dans la cellule par diffusion facilitée où elle est phosphorylée en présence de la choline kinase pour former la phosphocholine. La phosphocholine ainsi formée, en présence de la choline phosphatase cytidyltransférase et de cytidine triphosphate (CTP) aboutit à la formation de CDP-choline. La dernière étape est la combinaison de CDP-choline avec le DG (formé à partir de l'acide phosphatidique comme cité précédemment), en présence de la choline phosphotransférase microsomiale (CPM) pour former la PC (figure 7).

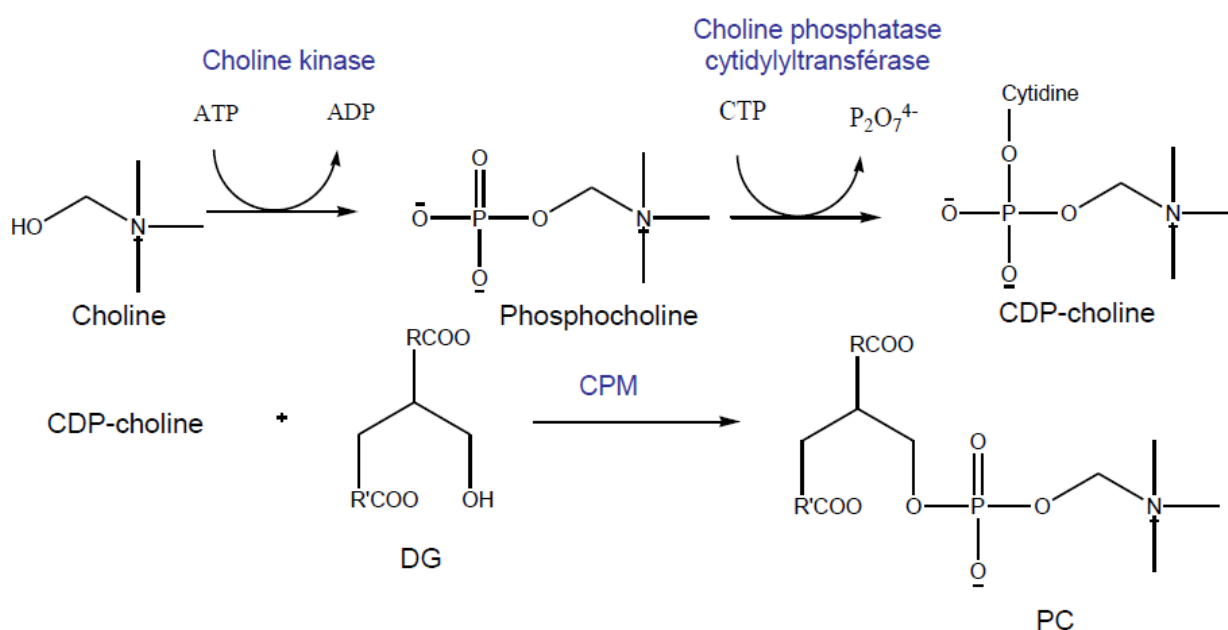


Figure 7: Voie métabolique de synthèse de PC.

La biosynthèse de la PC à partir de la PE se fait dans les microsomes hépatiques. La PE est méthylée progressivement en mono-, di-, et triméthyl-PE sous l'action de la phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase (PMETase) et en présence d'un donneur de groupement méthyl, la S-adénosylméthionine (Vance et Schneider, 1981). La méthylation des PE est associée à certains événements cellulaires tels que la transduction du signal et la synthèse des PC riches en AA (Hirata et Axelrod, 1980).

Dans le cerveau:

Les travaux de Ross et al. (1997) suggèrent que le cerveau humain possède deux formes de choline kinase ou deux sites sur la même enzyme, l'un de faible affinité et le second de haute affinité pour la choline. L'importance relative de ces deux sites dépend de la concentration de choline présente dans le cerveau.

Les activités de méthylation des PL ont été décrites dans des fractions enrichies en myéline provenant de cerveau de rat (Hattori et al., 1984). La méthylation des PE est très active dans les axones (Vance et al., 1991). Une autre étude, réalisée par Tsvetnitsky et al. (1995) suggère que la myéline de cerveau de rat contient différents isoformes de phospholipide N-méthyltransférase (PLMTase). L'activité de la phosphatidyléthanolamine N-méthyltransférase (PEMTase) du cerveau est influencée par les niveaux d'AG n-6 présents dans l'alimentation et la proportion d'AG n-6/n-3.

I.3.2.2 Biosynthèse des phosphatidyléthanolamines

Différentes voies de synthèse ont été mises en évidence pour la biosynthèse des PE. Une voie de synthèse similaire à celle de la PC a été décrite (figure 8). L'éthanolamine remplace la choline et la PE remplace la PC. Cette voie de synthèse se déroule dans le réticulum endoplasmique où les têtes polaires des PL peuvent s'échanger (Jelsema et Morre, 1978).

Une autre voie de synthèse de la PE consiste en la décarboxylation de la PS dans les mitochondries en présence de la PS décarboxylase (figure 8).

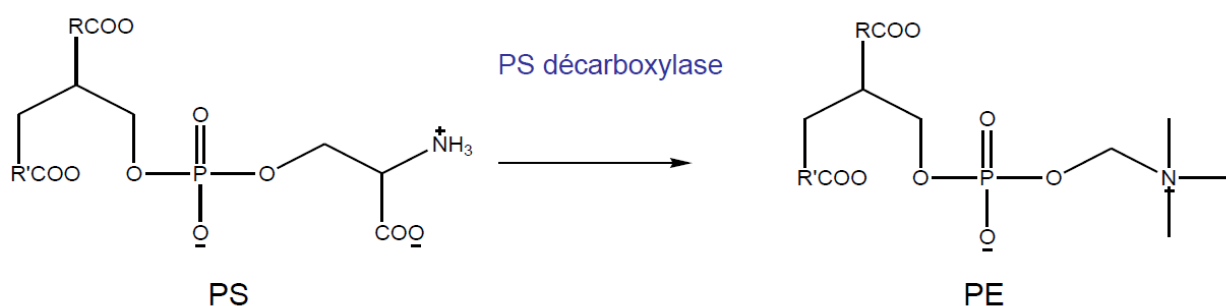


Figure 8: Voie de synthèse de la PE par décarboxylation de la PS.

I.3.2.3 Biosynthèse des phosphatidylsérines et phosphatidylinositols

Les PS sont formées à partir des PE par une réaction d'échange de base calcium-dépendante dans le réticulum endoplasmique (Siddiqui et Exton, 1992). Cette réaction peut également se produire en échangeant la choline de la PC avec de la sérine. Deux enzymes spécifiques ont été mises en évidence : la PS synthase-1 (PSS1) qui échange la choline et la sérine, et la PS synthase-2 (PSS2) qui remplace la fonction éthanolamine par la sérine (Grandmaison et al., 2004).

Les PI sont synthétisés à partir de l'inositol et du CDP-DG en présence de l'enzyme PI-synthase.

I.3.2.4 Biosynthèse des phosphatidylglycérols

La synthèse des PG se fait selon 2 étapes. Dans un premier temps, le CDP-DG réagit avec un glycérol-3-phosphate pour former du PG-phosphate qui est alors hydrolysé pour former du PG (Kiyasu et al., 1963).

Les cardiolipides sont des diphosphatidyl-glycérol (dans lesquels deux acides phosphatidiques estérifient symétriquement les deux fonctions alcool primaires de la même molécule de glycérol) formés dans les mitochondries à partir du PG et de CDP-DG grâce à l'enzyme cardiolipine-synthase (Schlame et Hostetler, 1997). Les cardiolipides (qui constituent 9% à 15% des membranes cardiaques) ont été découverts dans le cœur de bœuf par Pangborn en 1942 et leur biosynthèse a été décrite dans le cœur de rat en 1994 (Hatch, 1994).

I.3.3 Glycérophospholipides et distribution cérébrale

Les PC (42-44 % des PL totaux), les PE (36-40% des PL totaux) et les PS (11-13% des PL totaux), constituent les 3 classes majoritaires de phospholipides cérébraux. Les plasmalogènes (EtnPlsm) représentent 40-60% des PE du cerveau. Il existe également des classes minoritaires telles que les sphingomyélines (SM, 5-6 % des PL totaux) et les PI (2-3% des PL totaux) (Sastry, 1985). Ces classes de phospholipides cérébraux présentent des proportions différentes d'acide gras.

La composition lipidique de différentes zones cérébrales a été établie lors d'études menées sur le rat (Chavko et al., 1993). Cette équipe a étudié la composition lipidique dans les cortex frontal et entorhinal, l'hippocampe, le ganglion basal, le cervelet et le bulbe rachidien de rats. La teneur totale en lipides (PL et lipides neutres) est la plus élevée dans le bulbe rachidien ou la medulla oblongata, suivie par l'hippocampe, le cervelet, les noyaux gris centraux, le cortex frontal et le cortex entorhinal. Ces régions cérébrales sont majoritairement riches en PC et PE avec des pourcentages voisins de 17% des lipides cérébraux totaux.

Si les PC et les PE sont les classes les plus représentées de PL dans le cerveau, ce sont les PE et les PS qui sont les plus riches en DHA (Garcia et al., 1998). En effet, des études antérieures ont montré que le DHA est particulièrement présent dans la matière grise du cerveau (O'Brien et Sampson, 1965) où il représente environ 1/3 des AG estérifiés dans les PS et les PE. Le pourcentage de DHA trouvé dans les PC est beaucoup plus faible puisqu'il est inférieur à 5% dans le cerveau.

En analysant la composition en acides gras du cortex humain (15 femmes et 15 hommes) âgés de 29 à 45 ans, l'AA est préférentiellement incorporé en position *sn*-2 des PI (25 à 30% des PI totales) et des PE (10 à 20% des PE totales). Le DHA quant à lui, est majoritairement incorporé en position *sn*-2 des PE et des PS (25 à 35% des PE et des PS totales) (McNamara et Carlson, 2006). Au sein des PE, le DHA peut en particulier être incorporé dans les plasmalogènes à éthanolamine (EtnPlsm).

I.3.4 Remodelage des phospholipides

Outre la capacité de synthèse *de novo*, les cellules sont dotées de voies alternatives responsables du remodelage de la composition en AG des PL.

Lands et Merkl ont proposé un mécanisme de remodelage des phospholipides par un cycle de dé-acylation/ré-acylation (cycle de Lands) (Lands et Merkl, 1963).

Un autre mécanisme de remodelage des PL implique des réactions de transacylation dépendantes ou indépendantes du coenzyme A. Ces mécanismes de remodelage des phospholipides font intervenir un grand nombre d'enzymes dont certaines possèdent des spécificités de substrat pour les acides gras saturés ou polyinsaturés, ainsi que pour les différentes sous-classes de PL.

Le remodelage des PL implique également différentes phospholipases et ceci en libérant les AGPI des GP membranaires.

I.3.4.1 Voies de dé-acylation/ré-acylation

Cette voie de remodelage des PL, également appelée voie de Lands (figure 9), nécessite la libération d'un des deux acyles gras par une phospholipase A₁ (PLA₁) ou A₂ (PLA₂) générant ainsi un lysoPL. L'estérification d'un nouvel acide gras dans ce lysoPL se déroule alors en deux temps. L'acide gras doit d'abord être activé sous forme d'acyl-CoA. Cette réaction est catalysée par une acyl-CoA synthétase et nécessite la présence d'ATP et de Mg²⁺.

Il a été montré que, dans la majorité des tissus, l'activité acyl-CoA synthétase est plus élevée pour l'AA que pour les autres acides gras (MacDonald et Sprecher, 1991 ; Reddy et Bazan, 1984). Une activité DHA-CoA synthétase a été mesurée dans des extraits de cerveaux (Reddy et Bazan, 1985) et de rétines de rats. Une autre enzyme, l'acyl-CoA hydrolase, catalyse la dissociation de l'acide gras et du coenzyme A. La deuxième étape correspond au transfert de l'acide gras activé (acyl-CoA) vers un lysoPL. Cette étape est catalysée par une acyl-CoA : lysoPL acyltransférase. L'activité acyl-CoA : 1-acyl-2-lysoPC acyltransférase a été décrite dans les fractions cytosoliques, microsomales et mitochondriales de nombreux tissus et types cellulaires de différentes espèces (Yamashita et al., 2014).

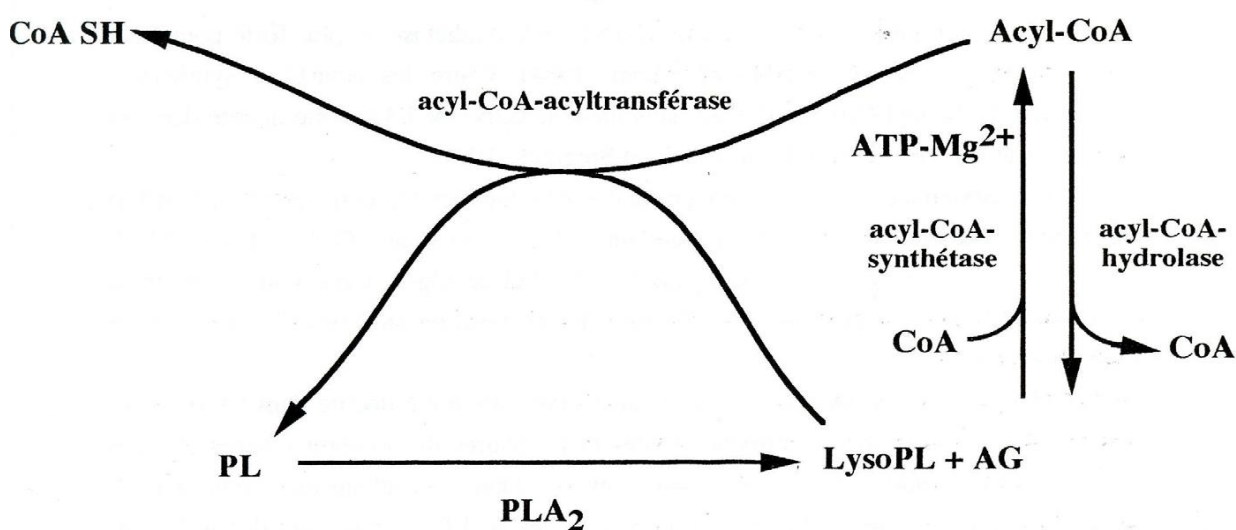


Figure 9: Cycle de dé-acylation/ré-acylation (Voie de Lands).

I.3.4.2 Voies de transacylation

En plus des voies de dé-acylation/ré-acylation catalysées par des acyl-CoA décrites précédemment et représentées dans cette partie par la figure 10.A, la ré-acylation des lysoPL peut également s'effectuer par un mécanisme de transacylation (figure 10.B et 10.C) utilisant des PL comme donneurs d'AG. Cette réaction est catalysée par différentes enzymes appelées transacylases qui possèdent aussi des spécificités de substrat *vis-à-vis* de l'AG transféré et *vis-à-vis* des PL « donneurs » ou « accepteurs ». Deux processus de transfert ont été décrits, l'un étant dépendant du coenzyme A, l'autre non.

La transacylation CoA-dépendante (figure 10.B) a été mise en évidence la première fois dans les microsomes de foie de lapin et a depuis été retrouvée dans la plupart des tissus et types cellulaires (Sugiura et al., 1988). Cette activité ne présente pas de forte spécificité de substrat. En revanche, la transacylation CoA-indépendante (figure 10.C), mise en évidence par Kramer et Deykin en 1983, est plus spécifique des AGPI à longue chaîne comme l'AA, l'EPA et le DHA (Kramer et Deykin, 1983). Il a notamment été montré que dans les macrophages alvéolaires de lapin et le cerveau de rat, les transacylases CoA-indépendantes transfèrent de manière très sélective le DHA en position *sn*-2 des lyso-plasmalogènes-PE (Masuzawa et al., 1989).

Enfin, la figure 10.D représente une activité lysophospholipase/transacylase. Un groupement acyle en position *sn*-1 d'un lysoPL est transféré vers la position *sn*-2 d'un autre lysoPL en présence de l'enzyme lysophospholipase/transacylase aboutissant à la formation d'un PL et d'un phosphoglycéride.

L'ensemble de ces activités spécifiques de remodelage est représenté dans la figure 10:

- A- Acyl-CoA.
- B- Transacylation CoA-dépendante.
- C- Transacylation CoA-indépendante.
- D- Activité lysophospholipase/transacylase.

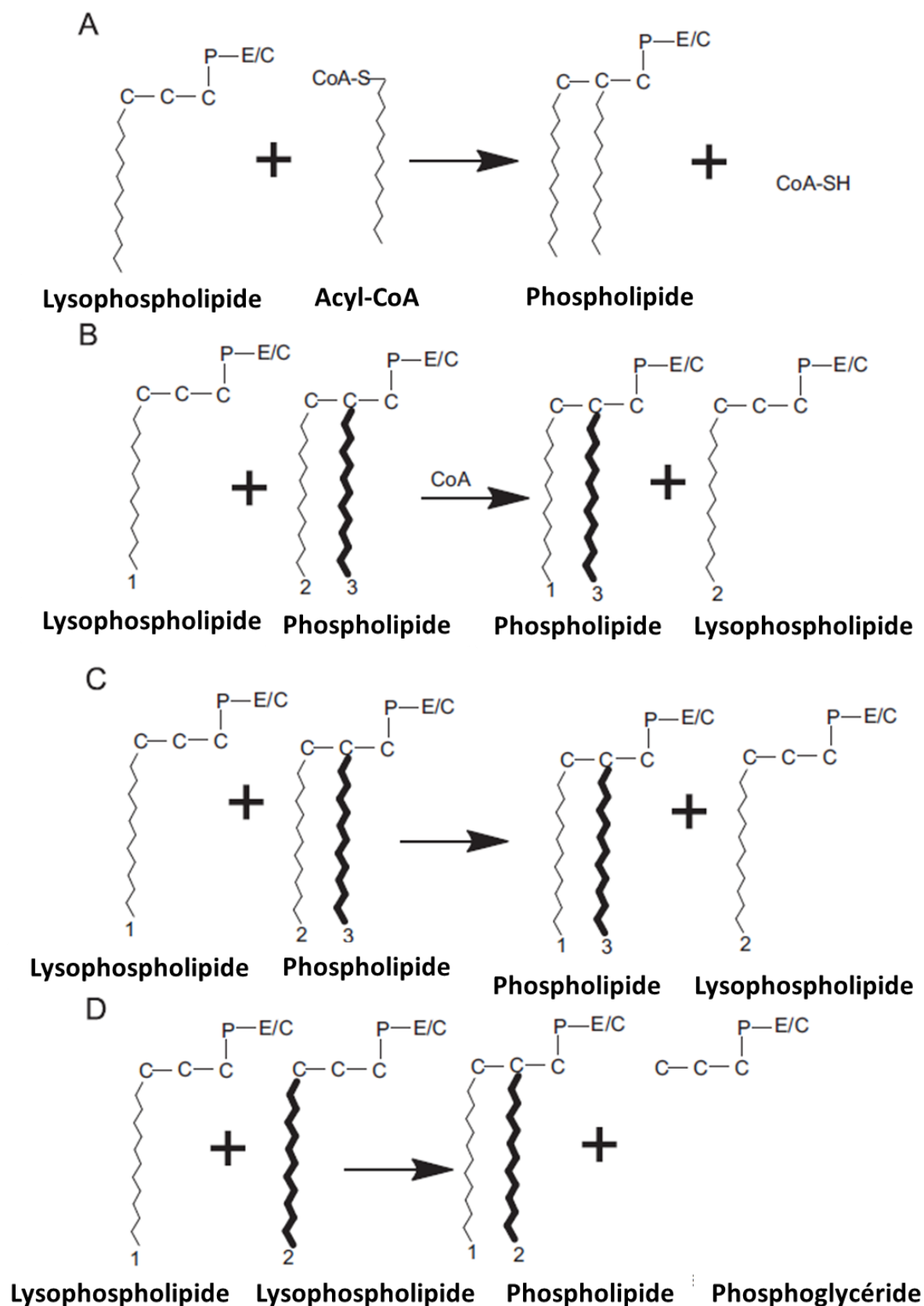


Figure 10: Remodelage des glycérophospholipides (E/C: Ethanolamine/Choline),

(d'après Kitson et al., 2012)

Dans le cerveau :

Le cerveau est doté de l'équipement enzymatique responsable du remodelage de la composition en AG des PL.

La synthèse des plasmalogènes riches en AA et DHA est réalisée par la voie de dé-acylation/ré-acylation (Onuma et al., 1984). Une activité acyl-CoA:lysophospholipide acyltransférase a été observée dans différentes structures cérébrales comme les microsomes et les noyaux des cellules du cortex cérébral de lapin âgé de 15 jours (Baker et Chang, 1981), la myéline de rats âgés de 6 à 8 semaines (Vaswani et Ledeen, 1989) et le cerveau humain (Ross et Kish, 1994).

Baker et Chang (1981) ont mis en évidence que les acyl-CoA:lysophospholipide acyltransférases des microsomes et des noyaux des cellules du cortex cérébral ont une affinité différente envers l'arachidonoyl-CoA, suggérant l'existence de deux enzymes différentes.

Vaswani et Ledeen (1989) ont décrit, dans la myéline, le transfert de l'AA et de l'acide oléique, préalablement activés en acyl-CoA, à des lysoPC et des lysoPI. L'AA-CoA est plus réactif que l'oléoyl-CoA envers les lysoPC et l'activité de l'acyl-CoA:lysophospholipide acyltransférase, utilisant l'oléoyl-CoA, est plus importante pour les lysoPC que pour les lysoPI.

L'étude de Ross et Kish (1994) sur le cerveau humain montre que l'acyl-CoA:lysophospholipide acyltransférase possède une affinité différente en fonction du substrat, l'affinité pour l'arachidonoyl-CoA excédant de trois fois celle de palmitoyl-CoA. De plus, le taux d'acylation est fonction de la classe de lysophospholipides selon l'ordre lysoPI > lysoPC > lysoPS > lysoPE.

Dans les tissus cérébraux, des transacylations CoA-dépendante et CoA-indépendante existent aussi (Masuzawa et al., 1989 ; Ojima et al., 1987) avec une sélectivité acyl de la transacylase CoA-dépendante similaire à celle de l'acyl-CoA:lysophospholipide acyltransférase. Cette enzyme utilise les 1-acyl-2-lysoPC puis les 1-acyl-2-lysoPE comme PL accepteur (Masuzawa et al., 1989). La transacylase CoA-indépendante dans les microsomes de cerveau de rat est spécifique de l'AA et du DHA.

L'ensemble de ces résultats montrent que le cerveau possède l'équipement enzymatique nécessaire à la synthèse des PL et au remodelage de la composition en AG de ces PL.

La libération des AGPI, en particulier de l'AA et du DHA, à partir des PL membranaires est initiée par de nombreux agents activant des phospholipases (PLA). Les AGPI étant généralement estérifiés en position *sn*-2 des PL, leur hydrolyse est réalisée principalement par les phospholipases A₂ (PLA₂) qui représentent les hydrolases d'acyle avec les phospholipases A₁ (PLA₁). Les phospholipases C (PLC) et phospholipases D (PLD) représentent quant à elles les phosphodiesterases (figure 11).



Les phospholipases A₁

La PLA₁ catalyse l'hydrolyse de l'AG exclusivement en position *sn-1* des GP. Un acide gras libre (AGL) et un lysophospholipide (lysoPL) sont les produits d'une réaction d'hydrolyse PLA₁. Bien que l'activité de PLA₁ ait été détectée dans divers tissus et lignées cellulaires, seul un nombre limité de PLA₁ a été cloné. Le rôle biologique de l'hydrolase d'acyle a été défini par sa participation dans le cycle de dé-acylation/ré-acylation des GP.

Dans le cerveau:

Des PLA₁ hydrolysant les PE dans des conditions alcalines et en présence de cations bivalents ont été décrites dans le cerveau humain (Rooke et Webster, 1976), de rat (Dawson et al., 1982) et bovin (Pete et Ross, 1994). Une activité PLA₁ hydrolysant les PI a été également décrite dans le cerveau bovin (Ueda et al., 1993) et de rat (Hirasawa et al., 1981). Ueda et al. (1993) ont suggéré que la PLA₁ spécifique des PI pourrait être couplée avec une PLC spécifique des lysoPI.

La lipase endothéliale (LE), une PLA₁ des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique a été identifiée par Chen et Subbaiah (2007) comme étant responsable de la génération de lysoPL à DHA dans le plasma. Ils ont étudié la spécificité de substrat de cette lipase. La LE a montré une spécificité vis-à-vis de la tête polaire des PL : PE>PC>PS>PA et une préférence pour les espèces contenant du DHA en position *sn-2*. Par contre, elle est inactive dans l'hydrolyse des PL contenant une liaison éther. De plus, la LE est plus spécifique des PL que des TG.

Les phospholipases A₂

Les PLA₂ sont un groupe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison ester en position *sn-2* des GP et génèrent un AGL et un lysoPL. Chez les mammifères, plus de 19 isoformes différents de la PLA₂ ont été identifiés.

Les PLA₂ ont montré une participation à des événements physiologiques liés à la lésion des cellules, l'inflammation et l'apoptose (Murakami et al., 1997 ; Balsinde et al., 2006 ; Cummings et al., 2000).

Dans le cerveau:

Les premiers travaux mettant en évidence l'existence de phospholipases dans le cerveau datent de 1962. Ils ont montré que le tissu cérébral humain hydrolysait des PC marquées en AGL et en lysoPC (Gallai-Hatchard et al., 1962). Les activités PLA₂ ont ensuite été détectées dans des synaptosomes de cerveau de rat et dans des préparations de cellules neuronales et gliales de lapin (Woelk et al., 1978). Depuis, de nombreuses études ont identifié trois grands groupes de PLA₂: le groupe IV dépendante du calcium PLA₂ cytosoliques (cPLA₂), le groupe II PLA₂ sécrétées (sPLA₂), et le groupe VI PLA₂ Ca²⁺-indépendante (iPLA₂) (Murakami et Kudo, 2002).

Groupe IV dépendante du calcium, PLA₂ cytosoliques (cPLA₂)

Les cPLA₂ du groupe IV ont été identifiées pour la première fois dans les plaquettes sanguines humaines. Cette famille est composée de six membres (GIVA, B, C, D, E, F) (Ghosh et al., 2006). Elle est considérée comme le médiateur clé dans la libération de l'AA (Clark et al., 1991). L'implication des membres de la famille des cPLA₂ dans l'homéostasie des GP est peu connue. Quelques études ont suggéré que certaines pourraient être impliquées dans le remodelage des PL (Kainu et al., 2008). L'enzyme de cette famille la mieux étudiée est la GIVAPLA₂. C'est la seule PLA₂ qui a une préférence pour l'AA en position *sn-2* des

PL. Elle possède aussi une activité lysophospholipase et transacylase (Ghosh et al., 2006). Au niveau cérébral, la cPLA₂ a été détectée dans la fraction cytosolique de cerveau de rat et dans des astrocytomes humains (Stephenson et al., 1994 ; Clemens et al., 1996). Dans le cerveau humain, elle est principalement présente dans les astrocytes de la matière grise (Stephenson et al., 1994).

Groupe II, PLA₂ sécrétées (sPLA₂)

Les sPLA₂ tirent leur nom du fait qu'elles ont d'abord été découvertes dans les fluides digestifs du pancréas et de l'estomac ainsi que dans les venins de serpent. Dix sPLA₂, actives catalytiquement, ont été identifiées chez les mammifères (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X et XIIA) (Balestrieri et Arm, 2006). Les sPLA₂ ne possèdent pas de forte spécificité de substrat vis-à-vis de la nature de l'AG mais il a été montré que certaines sPLA₂ agissent préférentiellement sur les PL anioniques comme les PE, les PS et le PG par rapport aux PL neutres comme les PC. Cependant, Subbaiah et son équipe ont testé l'hydrolyse des PC-DHA (16:0/22:6-PC) par action des différentes sPLA₂ (sPLA₂ du groupe V, sPLA₂ du groupe X, sPLA₂ de venin de serpent) et de la lipase endothéliale (LE). Ils ont montré que 55% des PC-DHA sont hydrolysées en présence de la LE, des sPLA₂ du groupe X et de venin de serpent tandis que seulement 15% des PC sont hydrolysées par l'isoforme V des sPLA₂.

Groupe VI, PLA₂ Ca²⁺-indépendante (iPLA₂)

La famille iPLA₂ comprend six membres: iPLA_{2β}(VIA), iPLA_{2γ} (VIB), iPLA_{2δ} (VIC), iPLA_{2ε} (VID), iPLA_{2ζ} (VIE), et iPLA_{2η} (VIF) (Balsinde et Balboa, 2005 ; Burke et Dennis, 2009 ; Lei et al., 2010 ; Cedars et al., 2009 ; Balsinde et al., 2006). Les iPLA_{2β} et les iPLA_{2γ} sont connues pour avoir des activités PLA₁ et PLA₂ ainsi que des activités lyso-PLA (Cedars et al., 2009). En revanche, les iPLA_{2ε}, les iPLA_{2ζ}, et les iPLA_{2η} ont une activité PLA₁ et PLA₂ faible, mais une forte activité triglycéride (TG)-lipase (Cedars et al., 2009). Les iPLA_{2δ} disposent d'une faible activité PLA₁ et PLA₂, mais une forte activité lyso-PLA (Glynn, 2005).

Deux formes ont été séparées dans le cytosol de cerveau bovin. L'une possède une activité plus élevée envers les PE, la seconde est spécifique des plasmalogènes à éthanolamine (Hirashima et al., 1992).

Les phospholipases C

Les PLC hydrolysent la liaison entre le phosphate et le glycérol produisant ainsi un DG et un groupe phosphorylé. Les treize PLC de mammifères identifiés sont considérées comme phospho-spécifiques (Suh et al., 2008). Les PLC sont impliquées dans la transduction du signal (Fukami et al., 2010), plutôt que dans l'homéostasie des PL. Les PLC qui hydrolysent les PC ou PE ont été purifiées partiellement (Wolf et Gross, 1985 ; Clark et al., 1986).

Dans le cerveau humain, l'activité des PLC a été identifiée comme étant dépendante du calcium et des protéines G (Greenwood et al., 1995). PLC-γ1 qui est spécifique des PI génère l'inositol tri-phosphate (IP3) et le DG à partir du phosphatidylinositol PI(4,5)P2. Cette isoforme est hautement exprimée dans le cerveau et semble impliquée dans les fonctions neuronales aussi bien que dans diverses maladies neurologiques (Jang et al., 2013).

Les phospholipases D

Les PLD catalysent généralement la conversion d'un PL en acide phosphatidique et en choline ou éthanolamine. Les PLD sont impliquées principalement dans la transduction du signal. Trois isoformes, PLD₁, PLD₂ et mitoPLD, ont été clonées chez les mammifères (Jenkins et Frohman, 2005 ; Mansfeld et Ulbrich-Hofmann, 2009).

Les PLD sont activées après stimulation de récepteurs présents à la surface cellulaire par différents agonistes tels que les neurotransmetteurs, les hormones, les facteurs de croissance. L'activation des PLD implique des mécanismes multiples incluant les protéines G, l'élévation des concentrations de Ca^{2+} , les protéines kinases C et la phosphorylation des tyrosines.

Dans le cerveau :

L'activité enzymatique PLD a été mise en évidence pour la première fois en 1973 dans des membranes de cerveau de rats (Saito et Kanfer, 1973). Depuis, son activité a été détectée dans différentes régions du cerveau et dans différentes cellules notamment dans les cultures primaires d'astrocytes (Gustavsson et Hansson, 1990) et de neurones (Mangoura et Dawson, 1993). La PLD peut être aussi cytosolique (Wang et al., 1991). Elle est spécifique des PC et des PE tandis que la forme membranaire est spécifique des PC (Horwitz et Davis, 1993). Les deux formes PLD_1 et PLD_2 sont exprimées dans le cerveau. De nombreux travaux montrent l'implication de la PLD dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer, dans l'accident vasculaire cérébral et dans d'autres désordres neurologiques (Lindsley et Brown, 2012).

I.3.5 Les Lysophosphatidylcholines

I.3.5.1 Biosynthèse des lysophosphatidylcholines

Une lysophosphatidylcholine (lysoPC) est une phosphatidylcholine dont l'un des deux acides gras a été hydrolysé par une PLA_2 en position *sn-2* du squelette glycérol pour donner une 2-lysoPC ou par une PLA_1 en position *sn-1* pour donner une 1-lysoPC.

Les lysoPC sont sécrétées par le foie puis captées par les tissus. Elles sont une source importante d'AGPI, en particulier pour le cerveau (Thiès et al., 1992).

Dans le plasma, les lysoPC sont liées principalement à l'albumine et/ou aux lipoprotéines. Elles sont présentes en grande quantité dans le plasma représentant 5-20% des phospholipides totaux (Nelson, 1967).

Cependant, les voies de formation dans le plasma ne sont pas complètement comprises.

Quatre sources principales de lysoPC plasmatiques ont été décrites :

- Par action de la lipase hépatique (LH): elle hydrolyse les phospholipides présents dans les lipoprotéines (High Density Lipoprotein : HDL) et possède une préférence pour les PE par rapport aux PC. Elle participe donc peu à la formation du pool plasmatique des lysoPC (Azema et al., 1990).
- Par action de la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT) qui est sécrétée par le foie et qui circule dans le plasma essentiellement sous forme liée aux lipoprotéines, notamment les HDL et minoritairement aux LDL (Low Density Lipoprotein). Cette enzyme catalyse le transfert d'un acide gras en position *sn-2* d'une PC présente dans une HDL vers le groupe 3-hydroxyle du cholestérol pour former un ester de cholestérol et une lysoPC (Glomset, 1962). Subbaiah et al. (2004) ont montré que la spécificité de position de la LCAT humaine est altérée lorsque la concentration en 16:0-22:6-PC est augmentée suite à une supplémentation en DHA. Après un régime riche en DHA, le taux des *sn-2*-lyoPC-DHA plasmatique augmente 3,5 fois et celui des 16:0-22:6-PC augmente de 12% sans aucune modification des *sn-2*-lyoPC-16:0.

- Les lysoPC hautement insaturées sont également sécrétées par le foie après ingestion de TG insaturés (Brossard et al., 1996). Cependant, les mécanismes exacts de sécrétion des lysoPC par le foie ne sont pas fermement établis.
- Chen et Subbaiah (2007) proposent une synthèse plasmatique de lysoPC grâce à l'action d'une lipase endothéliale (LE) comme mentionné précédemment.

I.3.5.2 Propriétés des lysophosphatidylcholines

Les lysoPC agissent sur des cibles multiples impliquées dans les maladies cardiovasculaires, le cancer et l'apoptose neuronale (Gendaszewska-Darmach, 2008 ; Sun et al., 2009). Des études ont montré que cette multiplicité de fonctions des lysoPC s'explique par le fait que les lysoPC agissent *via* un récepteur couplé aux protéines G qui est le récepteur G2A (Frasch et al., 2007). Des activités à la fois pro- et anti-inflammatoires des lysoPC ont été montrées. *In vitro*, les activités pro-inflammatoires des lysoPC incluent la stimulation du chimiotactisme des lymphocytes T humains (McMurray et al., 1993) et la stimulation de la production des cytokines MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) par des cellules HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) (Takahara et al., 1996), et des cytokines interleukines IL-6 et IL-8 par des cellules de l'artère coronaire (Aiyar et al., 2007).

Les lysoPC ont des effets cytotoxiques et peuvent s'accumuler dans des conditions pathologiques, tel que l'athérosclérose (Katz et Messineo, 1981). En effet, les lysoPC sont détectées au niveau des lésions athérosclérotiques et sont responsables des sécrétions de cytokines induisant un contexte inflammatoire au niveau des lésions. Elles activent le recrutement des lymphocytes T CD4⁺ dans les lésions d'athérosclérose, selon un mécanisme NF-KB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) dépendant, par augmentation de l'expression du récepteur CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) jouant ainsi un rôle important dans le développement de l'athérosclérose (Han et al., 2004).

L'ensemble de ces études est en faveur du caractère pro-inflammatoire des lysoPC.

Concernant l'activité anti-inflammatoire des lysoPC, Yan et al. (2004) ont montré que les lysoPC atténuent l'inflammation en augmentant l'activité anti-microbienne des neutrophiles par action sur leur stock de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et réduit les taux d'interleukines 1β (IL-1β) et de facteur de nécrose tumorale α (TNFα) circulants. D'autres études ont montré que les lysoPC sont capables de réduire l'inflammation en agissant au niveau intracellulaire et en augmentant les sécrétions de facteurs protecteurs des endothéliums comme la NOS (nitric oxide synthase) lors d'un choc septique (Zembowicz et al., 1995).

Chapitre II: L'acide docosahexaénoïque

Le DHA est le principal acide gras du cerveau et de la rétine. Il est estérifié en position *sn*-2 des GP, et plus particulièrement des plasmalogènes à éthanolamine (Bazan, 2003).

Une fois le DHA libéré par l'action d'une PLA₂, il est soit réincorporé dans les PL membranaires par des réactions de réacylation ou oxydé suivant plusieurs mécanismes enzymatiques et non enzymatiques en métabolites oxygénés variés.

I.1 Incorporation du DHA dans les phospholipides membranaires du cerveau

Le cerveau peut capter le DHA préformé à partir de la circulation, soit synthétisé par le foie (Scott et Bazan, 1989), soit apporté directement par l'alimentation (Sinclair, 1975). Une fois dans le cerveau, le DHA subit un cycle métabolique.

Le DHA provenant du plasma et lié aux protéines plasmatiques se dissocie de ces dernières et traverse la barrière hémato-encéphalique. Ensuite, il est activé par une acyl-CoA synthétase spécifique, la docosahexaénoyl-CoA synthétase (figure 12). Cette enzyme a une affinité très élevée pour son substrat ce qui permet au DHA d'être estérifié très rapidement dans un PL (Ross et al., 1997).

Une partie du docosahexaénoyl-CoA formé peut subir une β -oxydation dans les mitochondries des cellules et une autre partie est estérifiée par une acyl-CoA transférase en position *sn*-2 du glycérol-3-phosphate (la position *sn*-1 étant occupée par un acide gras saturé dans la plupart des cas). L'acide phosphatidique formé est ensuite transformé en DG par une phosphatidate phosphatase. Ces DG sont des précurseurs des TG, des PE et des PC (Ross et al., 1997).

Les PL peuvent ensuite être hydrolysés par une phospholipase A₂ (PLA₂) pour donner un lyso-2-phospholipide et un DHA libre.

Une partie du DHA libéré est utilisée dans la synthèse de dérivés oxygénés. Nous détaillerons les mécanismes de formation de ces dérivés dans les parties suivantes (I.2. Métabolisme oxygéné du DHA).

Le reste est réactivé par une acyl-CoA synthétase pour refaire un cycle (Green et al., 2008).

L'ensemble de ces mécanismes est représenté dans la figure 12.

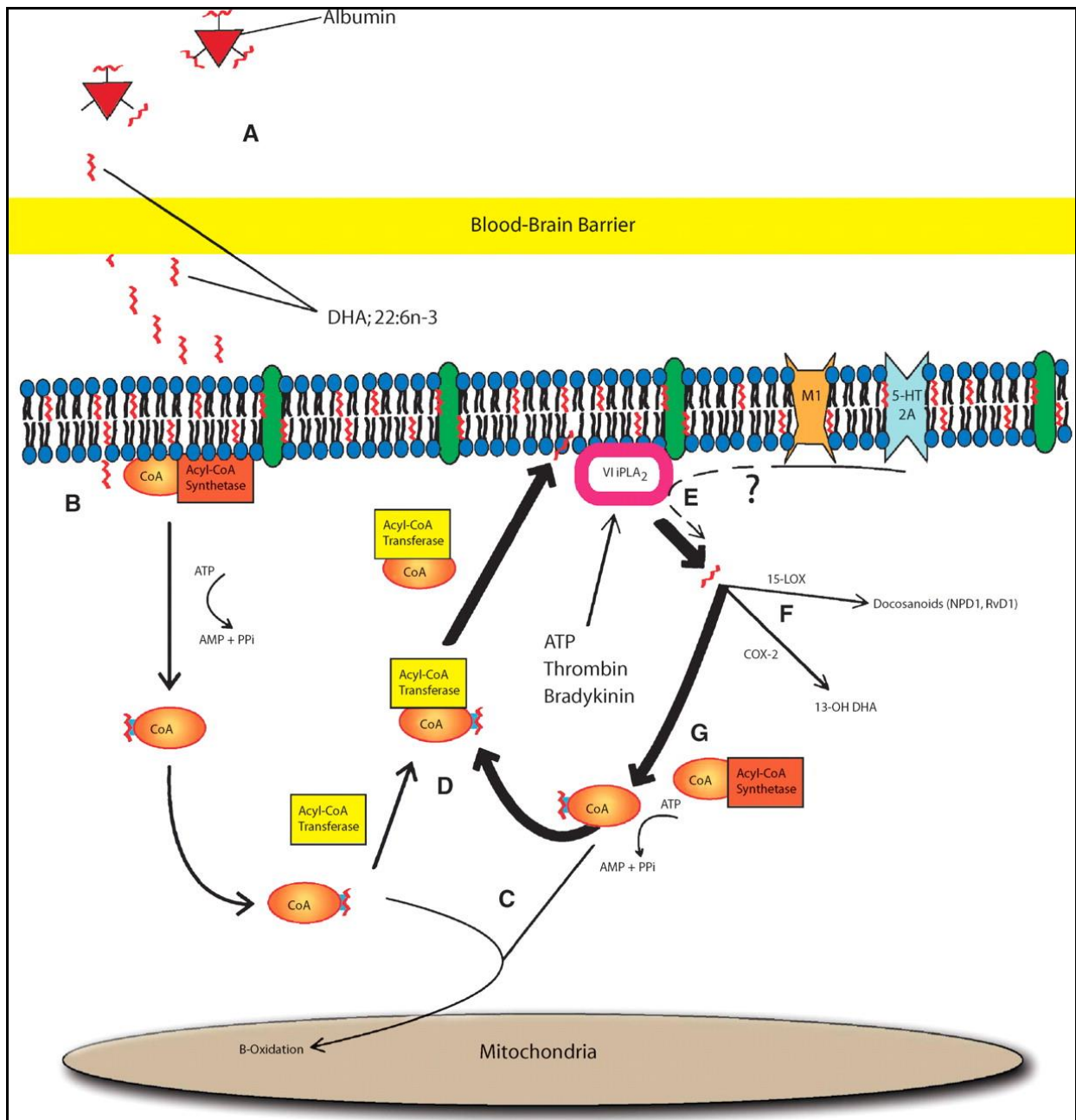


Figure 12: *Modèle pour le métabolisme de l'acide docosahexaénoïque.* Le DHA plasmatique est dissocié de l'albumine et passe à travers la barrière hémato-encéphalique (A) vers le cerveau où il est activé par une acyl-CoA synthétase (B). Une faible proportion de DHA subit une β -oxydation (C) dans les mitochondries et le reste est estérifié par une acyl-CoA transférase (D). Dans ce modèle, la phospholipase A₂ du groupe VI (iPLA₂) libère le DHA des phospholipides neuronaux (E). Une partie du DHA est convertie en dérivés oxygénés (F) et le reste est activé par une acyl-CoA synthétase (G).

(Green et al., 2008)

I.2 Métabolisme oxygéné du DHA

I.2.1 Oxydation enzymatique du DHA : Voie des lipoxygénases

Les premiers travaux portant sur les métabolites oxygénés du DHA ont montré que cet AGPI n'est pas un substrat pour la cyclooxygénase (COX) mais peut être oxygéné par diverses lipoxygénases (LOX) (Corey et al., 1983).

Les LOX sont des enzymes qui contiennent du fer non hémunique ($\text{Fe}^{2+} \gg \text{Fe}^{3+}$). Les LOX sont largement répandues dans les règnes animal et végétal (Grechkin., 1998 ; Kühn et Thiele., 1999). Ces enzymes catalysent la dioxygénation des AGPI porteurs d'au moins un motif 1,4-cis,cis-pentadiène. Elles sont généralement cytosoliques et contiennent 665 acides aminés (76 kDa). Elles fixent l'oxygène sur les carbones C5 (5-LOX), C12 (12-LOX) et C15 (15-LOX) du DHA.

I.2.1.1 Métabolites mono-hydroxylés du DHA

Les principaux métabolites mono-hydroxylés du DHA sont les 11-hydroxy-DHA (11-HDHA) et 14-hydroxy-DHA (14-HDHA) issus de l'activité 12-LOX, les 4-hydroxy-DHA (4-HDHA) et 7-hydroxy-DHA (7-HDHA) issus de l'activité 5-LOX et le 17-hydroxy-DHA (17-HDHA) issu de l'activité 15-LOX. Les réactions d'oxydation enzymatique aboutissant à la formation de ces métabolites ont lieu en présence de glutathions peroxydases (GPx peroxydase) (Lee et al., 1984 ; Sawazaki et al., 1994). Les dérivés mono-hydroxylés du DHA inhibent l'agrégation plaquettaire induite par l'AA exogène, par l'adénosine-5'-diphosphate (ADP) ou induite par le collagène (Karanian et al., 1996).

L'ensemble de ces métabolites est représenté dans la figure 13 ci-dessous.

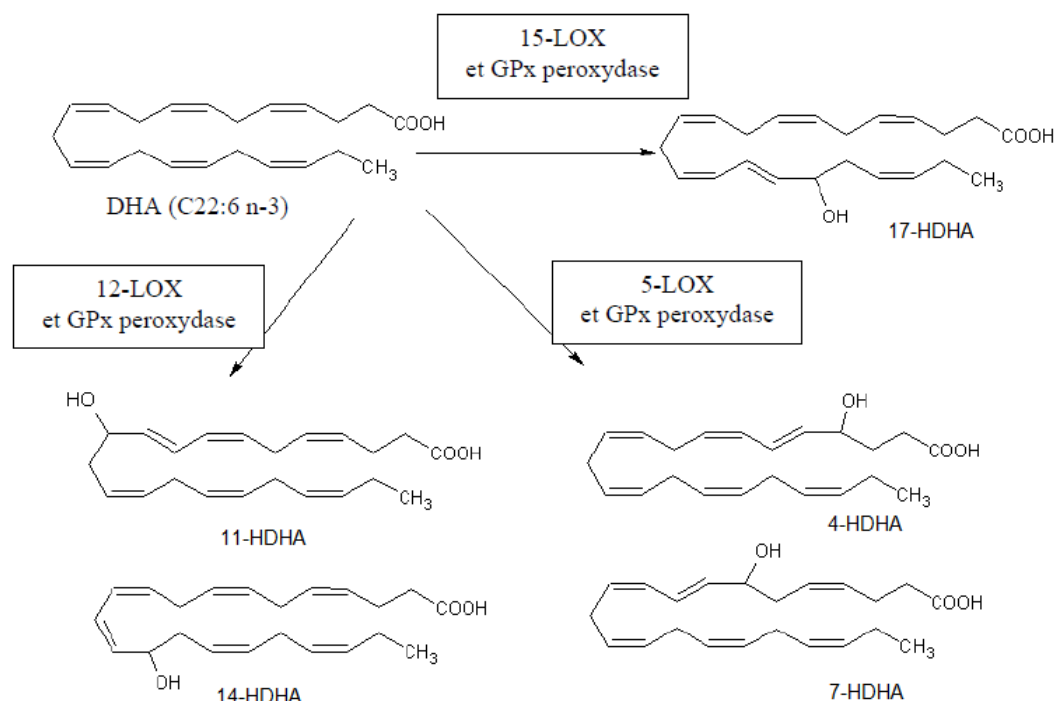


Figure 13: Schéma de biosynthèse des principaux métabolites mono-hydroxylés du DHA.

I.2.1.2 Métabolites di-hydroxylés du DHA

Docosatriènes: Protectines et Marésines

Les docosatriènes sont des métabolites di-hydroxylés du DHA, caractérisés par la présence d'un triène conjugué. Les principaux docosatriènes sont les protectines et les marésines.

♦ ***Protectines:***

Des travaux récents montrent que le DHA subit une lipoxygénation par la 15-LOX pour former dans un premier temps du 17(S)-hydroperoxy-docosahexaénoïque (17(S)-HpDoHE). Une époxydation enzymatique du 17(S)-HpDoHE permet la formation d'un époxyde intermédiaire qui aboutit à la synthèse de l'acide 10(R),17(S)-dihydroxy-docosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-hexaénoïque (Serhan et al., 2006 ; Levy et al., 2007) ou protectine D1 (PD1).

La protectine D1 (PD1) a été mise en évidence pour la première fois dans les cellules mononucléaires activées. Elle est aussi présente dans le cerveau où elle est nommée neuroprotectine D1 (NPD1). Elle a été appelée « protectine » en raison de ses actions protectrices et anti-inflammatoires (Hong et al., 2003 ; Mukherjee et al., 2004 ; Serhan et al., 2014) dans les tissus. La PD1/NPD1 prévient notamment l'apoptose neuronale responsable de neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer (Lukiw et al., 2005 ; Bazan, 2006 ; Mukherjee et al., 2004 ; Serhan et al., 2006), elle diminue l'inflammation allergique des voies respiratoires et l'asthme associé (Levy et al., 2007). Dans les accidents vasculaires cérébraux, la PD1 est augmentée dans le cerveau. Elle diminue les dommages cérébraux et inhibe l'infiltration de leucocytes ainsi que l'expression de gènes pro-inflammatoires (Marcheselli et al., 2003). Le mécanisme de synthèse de la PD1/NPD1 est représenté par la figure 14.

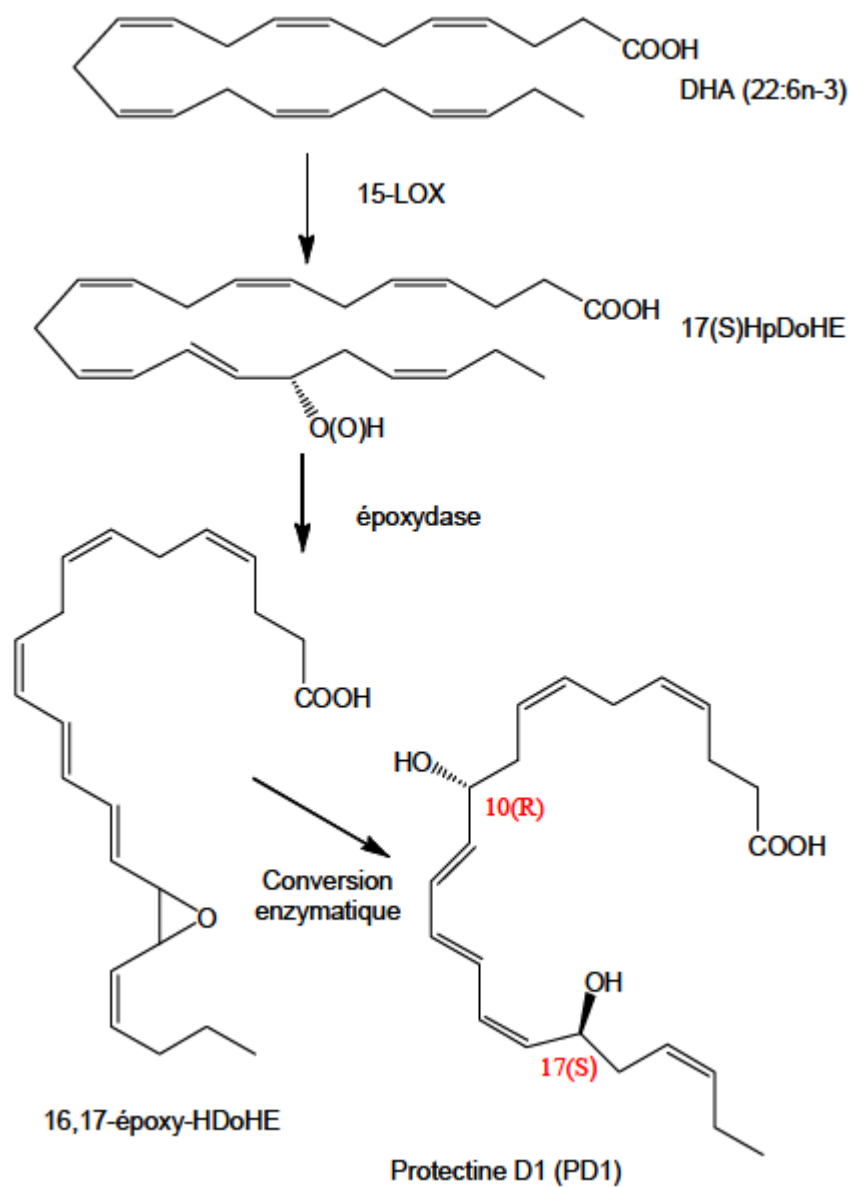


Figure 14: Schéma de biosynthèse de la protectine D1.

Le DHA est converti en 17(S)HpDoHE par une 15-LOX. Le 17(S)HpDoHE est ensuite transformé en Protectine D1 via un époxyde intermédiaire.

Chen et al. (2011) ont caractérisé un isomère de la PD1, nommé PDX qui est l'acide 10(S), 17(S)-dihydroxy-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-hexaénoïque (figure 15) et qui est produit par une double oxygénation du DHA par la 15-LOX. La géométrie du triène conjugué est *E/Z/E* pour la PDX et *E/E/Z* pour la PD1. Ce composé diffère par la stéréochimie du carbone 10 qui est R pour PD1 et S pour PDX (figure 15).

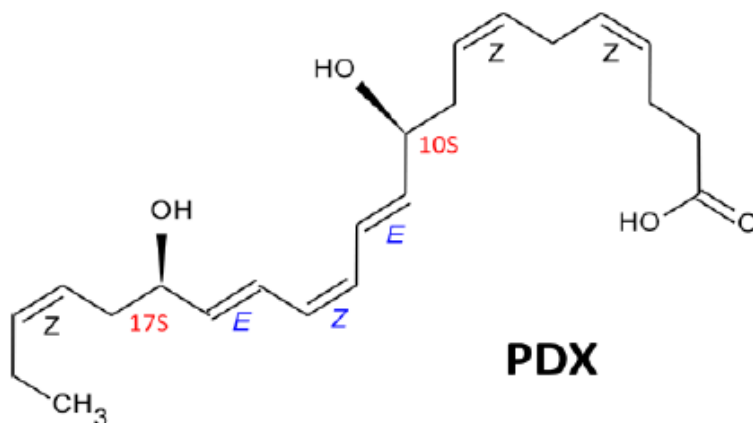


Figure 15: Structure de PDX (isomère de PD1).

(Chen et al., 2011)

La PDX inhibe l'agrégation plaquettaire *via* l'inhibition de la cyclooxygénase COX-1 et de l'action du thromboxane A₂ (TxA₂). Cette propriété est due à la géométrie particulière du triène conjugué (trans, cis, trans) formé par double lipoxygénation (Chen et al., 2011). Ceci a été confirmé par les études de Liu et al. (2014) qui ont montré que la PDX est un inhibiteur de la COX-1 ainsi que la COX-2 activée durant l'inflammation. Ils ont prouvé que la PDX diminue le relargage des espèces réactives de l'oxygène produites par les neutrophiles humains *in vitro*. L'ensemble de ces données suggèrent que la PDX pourrait être considérée comme un agent anti-inflammatoire et anti-agrégant.

En plus des effets anti-inflammatoire et anti-agrégant, la PDX diminue la réplication du virus Influenza chez la souris. Sa production est inversement corrélée à la pathogénicité du virus H5N1 (Morita et al., 2013).

Des études récentes soulignent l'implication de la PDX dans la résistance à l'insuline et dans le diabète de type 2. En effet, White et al. (2014) ont montré que la PDX a une activité gluco-régulatrice. Après administration de la PDX chez des souris obèses diabétiques db/db, les concentrations de l'interleukine-6 du muscle squelettique augmente et la sensibilité à l'insuline est améliorée.

♦ **Marésines :**

Les marésines sont des médiateurs de DHA ayant des propriétés anti-inflammatoires et de protection de type "pro-résolvine" (Serhan et al., 2014).

La 1-Marésine (MaR 1) ou l'acide 7(R),14(S)-dihydroxy-docosa-4Z,8,10,12,16Z,19Z-hexaénoïque a été identifiée la première. Le DHA est converti en acide 14(S)-hydroperoxy-docosahexaénoïque (14(S)-HpDoHE) par l'intermédiaire de la 12-LOX. Le 14(S)-HpDoHE est ensuite converti enzymatiquement en 13(S),14(S)-époxy-marésine qui est hydrolysée par voie enzymatique par un cation carbonium aboutissant à la formation du MaR1. Elle est un puissant médiateur qui stimule la phagocytose des macrophages.

Un autre isomère 7(S),14(S)-diHDoHE de MaR1 est formé par un double mécanisme de lipoxygénation, et est moins puissant *in vitro* et *in vivo* (Serhan et al., 2009).

Une nouvelle marésine nommée 13(R),14(S)-diHDHA a été identifiée récemment.

La synthèse schématisée des marésines est représentée par la figure 16.

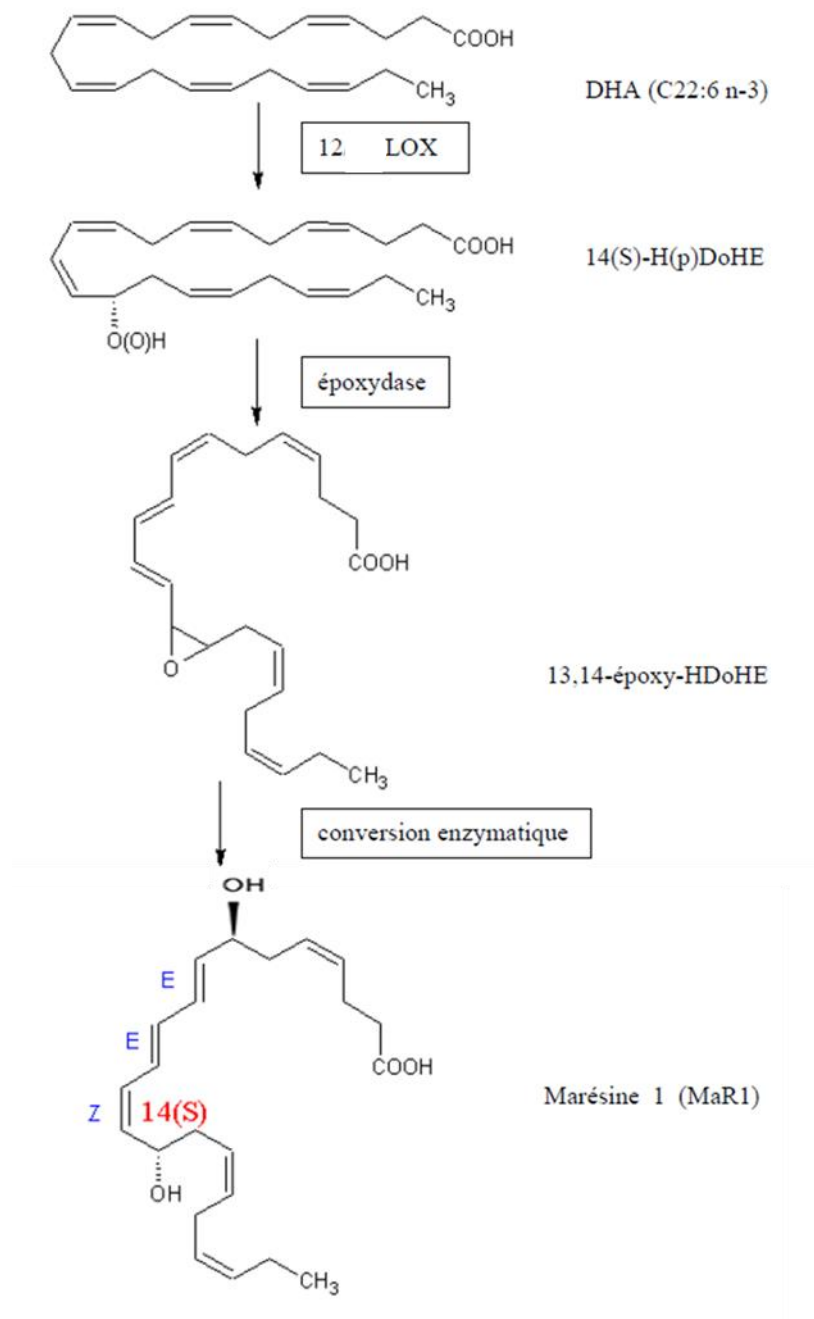


Figure 16: Schéma de biosynthèse de Marésine 1 (MaR1).

Le DHA est converti par une 12-LOX en 14S-hydroperoxy-DHA puis en Marésine 1 via un époxyde intermédiaire.

I.2.1.3 Résolvines

Le terme “résolvine” ou « resolution-phase interaction products » (Rv) a été proposé par Serhan et al. (2000). Les résolvines sont des molécules di- et trihydroxylées formées à partir des AGPI n-3 par un processus qui peut être déclenché lors de l’inflammation et favorisé par l’aspirine mais aussi en absence d’aspirine. Les composés dérivés de l'EPA et du DHA sont appelés, respectivement, résolvines E et résolvines D.

Ces composés ont été découverts dans les exsudats inflammatoires lors de la phase de résolution de la réponse inflammatoire (Serhan et al., 2000). Ils agissent en empêchant l’entrée des neutrophiles aux sites d’inflammation et en réduisant le volume des exsudats.

Les études sur les exsudats de souris ayant consommées du DHA et traitées avec de l'aspirine dans la phase de résolution de l’inflammation fournissent la première preuve de nouvelles voies endogènes qui conduisent à la formation des résolvines D. La COX-2, acétylée par l’aspirine, convertit dans les cellules hypoxiques endothéliales humaines le DHA en 17(S)-hydroxy-DHA qui est capté par les neutrophiles humains. Ce dernier est transformé en deux séries de produits di-hydroxylés ensuite trihydroxylés (résolvine 1, résolvine 2, résolvine 3, résolvine 4). Le mécanisme implique une oxygénation au niveau des carbones 4 et 7 (Serhan et al., 2002) (figure 17).

Ces molécules ont été également trouvées dans le cerveau (Serhan et al., 2002 ; Hong et al., 2003).

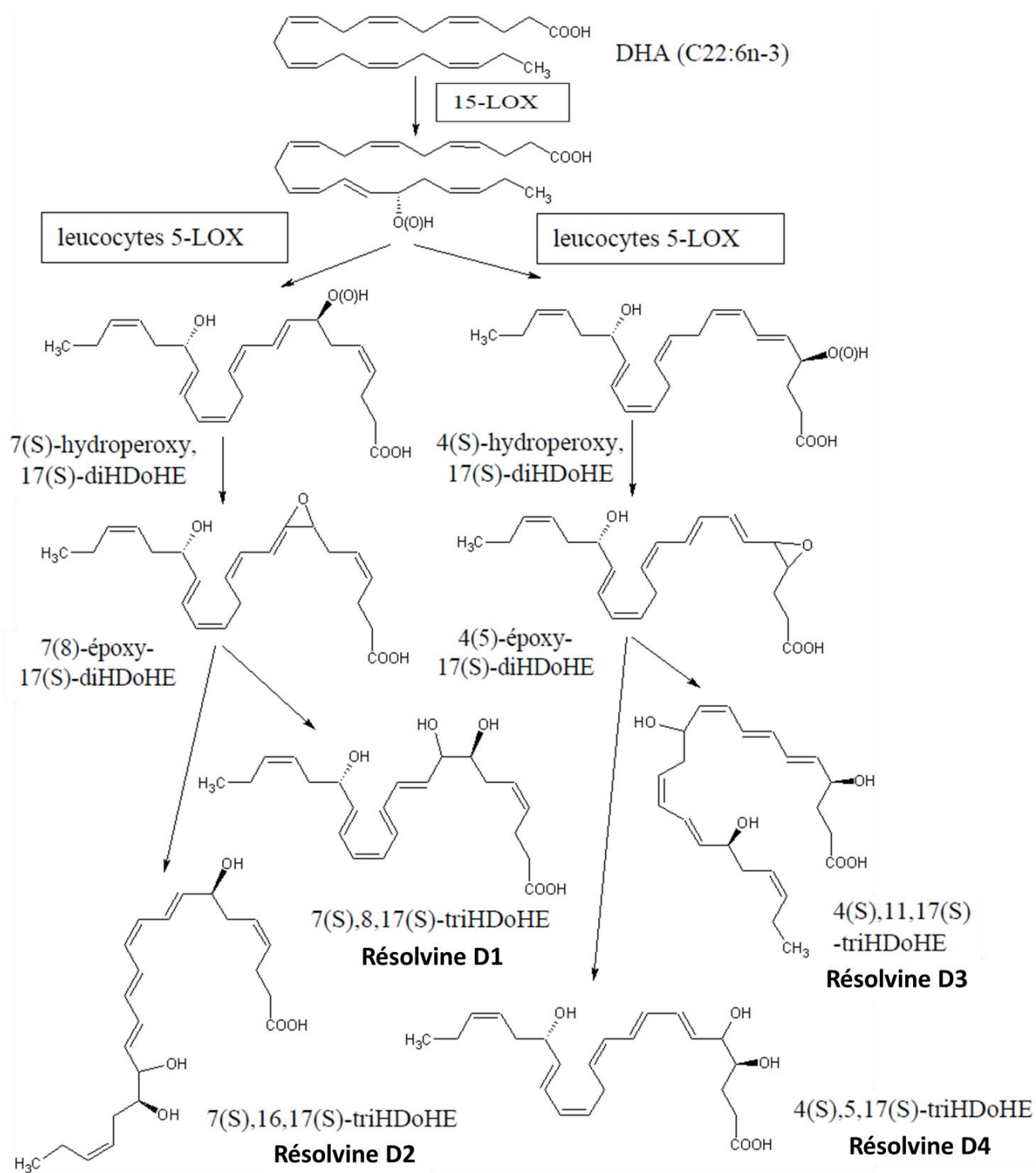


Figure 17: Schéma de biosynthèse des résolvines de la série D (RvD).

I.2.2 Oxydation non-enzymatique du DHA

Les AGPI n-3 sont extrêmement sensibles à l'oxydation non-enzymatique due aux attaques radicalaires lors d'une augmentation du stress oxydant dans les cellules. Leur peroxydation est d'autant plus importante que le nombre de doubles liaisons est élevé.

L'oxydation non-enzymatique du DHA conduit à la production d'aldéhydes réactifs, comme le 4-hydroxy-hexéanal (4-HHE), qui peuvent modifier de façon covalente les biomolécules ce qui conduit à des perturbations importantes de la fonction cellulaire. Chez l'Homme, Bradley et al. (2012) ont confirmé l'implication de la peroxydation lipidique du DHA et plus précisément le rôle du 4-HHE dans la progression de la maladie d'Alzheimer. Ils ont dosé les concentrations de 4-HHE formant notamment des adduits avec les protéines dans les différentes régions cérébrales comme l'hippocampe, le gyrus para-hippocampal, le gyrus temporal supérieur et moyen, le cervelet chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer en comparaison avec des sujets sains. Ils ont montré que ces concentrations sont plus élevées dans l'hippocampe et le gyrus para-hippocampal des sujets atteints de la maladie. *In vitro*, ils ont remarqué que la survie des cellules primaires corticales traitées avec du HHE diminue en fonction du temps et des concentrations.

Cette peroxydation lipidique non enzymatique produit aussi des neuroprostanes (NPs). Ces molécules ont été nommées ainsi car le DHA est principalement localisé dans le système nerveux. Les F₄-neuroprostanes ont été détectées dans le cerveau de rats nouveau-nés et dans le cortex des porcs nouveau-nés (Roberts et al., 1998). Ils sont aussi détectés dans le liquide cébrospinal des cerveaux humains et leurs taux sont plus élevés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ce sont des marqueurs du stress oxydatif et leur formation peut affecter les fonctions neuronales.

D'autres auteurs ont identifié d'autres produits de peroxydation non-enzymatique du DHA nommés neurofuranes (NFs) (Song et al., 2008) et neuroketals (NKs) (Bernoud-Hubac et al., 2001). Des concentrations plus élevées de NFs ont été observées dans le cortex cérébral d'un modèle de souris de la maladie d'Alzheimer (Song et al., 2008).

Le dosage des produits d'oxydation du DHA peut être utile dans le diagnostic des désordres neurologiques (maladie d'Alzheimer et de Parkinson, syndrome de Down, AVC) (Shichiri, 2014).

Bien que les produits d'oxydation du DHA soient impliqués dans certaines pathologies nerveuses, le DHA montre des effets neuroprotecteurs au niveau cérébral. Nous détaillons ces effets dans la partie suivante.

I.3 Effets neuroprotecteurs du DHA

De nombreuses études précliniques et cliniques indiquent que le DHA a des effets neuroprotecteurs dans un certain nombre de troubles neurodégénératifs y compris la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Chez ces patients, le taux de DHA cérébral diminue d'où l'idée d'une supplémentation en AGPI n-3.

La diminution des concentrations de DHA cérébral chez ces patients pourrait être attribuée à une déficience de l'enzyme 'D-bifunctional protein' (codée par le gène de HSD17B4), qui catalyse la conversion de l'acide tétracosahexaénoïque (C24:6n-3) en DHA. Cette déficience d'enzyme diminue la biosynthèse du DHA dans le foie, ce qui réduit le flux de cet acide gras neuroprotecteur au cerveau (Astarita et al., 2010).

Les effets bénéfiques de supplémentation en DHA dépendent du stade de progression de ces maladies (Van Marum, 2008 ; Wurtman, 2008 ; Freund-Lévi et al., 2006). Des effets positifs ont été observés chez des patients ayant des symptômes peu développés de la maladie d'Alzheimer. En effet, les personnes présentant une maladie très peu développée ont un déclin cognitif moins rapide lorsqu'elles consomment du DHA par rapport au groupe placebo. Cependant, l'administration d'oméga-3 chez des patients ayant une maladie d'Alzheimer davantage développée ne retarde pas leur déclin cognitif (Freund-Levi et al., 2006).

Dans des modèles de souris transgéniques de la maladie d'Alzheimer, il a été montré que l'augmentation de teneur en DHA dans le cerveau, suite à une supplémentation en AGPI n-3, est associée à des réductions des divers aspects de la pathologie de la maladie tels que les concentrations d'amyloïde-béta ainsi qu'à une amélioration du comportement (Lim et al., 2005). De même, des corrélations significatives entre les concentrations de DHA dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et les concentrations des biomarqueurs de la maladie, protéine tau (diminution) et récepteur anti-inflammatoire de la cytokine -1RII (augmentation), dans le LCR, ont été établies (Freund Levi et al., 2014) chez des patients atteints de cette maladie.

Il a été montré qu'il existe une relation étroite entre les habitudes alimentaires et l'incidence de la maladie de Parkinson. Une étude prospective basée sur des questionnaires alimentaires, incluant 131 368 participants, a révélé qu'une alimentation basée sur le modèle des « régimes méditerranéens », traditionnellement composés de légumes, fruits et poissons, serait associée à une diminution d'incidence de la maladie de Parkinson (Gao et al., 2007). Cette étude n'a pas spécifiquement identifié les oméga-3 comme facteur protecteur, mais dans la mesure où le poisson constitue la source principale d'oméga-3 à chaîne longue, il est très probable que ces derniers jouent un rôle dans les effets bénéfiques rapportés.

Une autre étude prospective basée sur une cohorte de population a été réalisée. Plus de 5000 sujets ont été évalués de façon longitudinale pour le risque de développer la maladie de Parkinson, en se basant sur un questionnaire sur la consommation d'acides gras. Après un suivi de six ans, il a été observé que les fortes consommations d'oméga-3, notamment du DHA, étaient associées à une diminution du risque de développer la maladie de Parkinson (de Lau et al., 2005).

Il est plausible que le DHA soit bénéfique à plusieurs niveaux du processus de dégénérescence neuronale. En plus, de son rôle dans la fluidité membranaire, le relargage du DHA dans la cellule nerveuse peut promouvoir des mécanismes d'actions liés aux facteurs neurotrophiques, au stress oxydatif, à l'apoptose et à l'inflammation (Bousquet et al., 2011).

Outre son implication dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, de nombreux travaux montrent que le DHA est neuroprotecteur dans des modèles d'accident vasculaire cérébral. Belayev et al. (2009) ont montré que l'administration de DHA à faible et moyenne doses 3 heures après induction de l'ischémie cérébrale focale améliore les neuroscores et diminue la taille des infarctus cérébraux. La même équipe avait montré que l'administration de DHA complexé à l'albumine apportait une amélioration du comportement et une réduction de la taille d'infarctus cérébral dans le même modèle d'ischémie chez des rats jeunes (Belayev et al., 2005). En analysant les lipides cérébraux, ils ont révélé la formation de la neuroprotectine NPD1 dans l'hémisphère ipsilatéral, la NPD1 ayant été décrite comme inhibant des lésions cérébrales en contrôlant l'infiltration leucocytaire et l'expression de gènes pro-inflammatoires (Marcheselli et al., 2003). La même étude réalisée chez le rat âgé (18 mois) montre le même effet protecteur avec une augmentation de la survie des cellules (Eady et al., 2014). Plus récemment, la même équipe a montré par une étude IRM *ex vivo* que l'administration de DHA confère une neuroprotection durable 3 semaines après l'ischémie provoquée de la même façon que précédemment. L'amélioration neurocomportementale débute un jour après l'ischémie cérébrale focale (Hong et al., 2014).

Les mêmes auteurs montrent par un contrôle de la perméabilité de la BHE que le DHA diminue les dommages de la BHE et provoque une amélioration du comportement des rats (Hong et al., 2015).

L'ensemble des études précliniques et cliniques courantes suggèrent qu'un apport ciblé de DHA au cerveau pourrait s'avérer être une stratégie thérapeutique alternative pour différents troubles du système nerveux central. Cependant, les données actuelles ne permettent pas de savoir exactement sous quelle forme le DHA traverse la BHE pour s'accumuler ensuite dans le cerveau. Nous détaillons le passage du DHA à travers la BHE dans la partie suivante.

I.4 Passage du DHA à travers la barrière hémato-encéphalique

Puisque le taux de conversion de l'ALA en DHA est faible dans le cerveau, le DHA doit être capté à partir de la circulation sanguine. Il doit traverser la BHE qui forme l'interface cellulaire entre le sang et le parenchyme cérébral et qui par sa constitution cellulaire atypique est très sélective et peu perméable. Le DHA plasmatique peut être transporté sous différentes formes, soit sous forme non estérifiée (forme libre) ou estérifiée dans une lysoPC, les 2 formes étant liées à l'albumine (Dhopeshwarkar et Mead, 1973), soit sous forme estérifiée dans les triglycérides (Anderson et al., 1994), les phosphatidylcholines, ou les esters de cholestérol et liée aux lipoprotéines.

Cependant, la façon dont le cerveau capte le DHA plasmatique est encore matière à débats. Nous allons développer les différents modes de passage du DHA au cerveau

I.4.1 Transport du DHA non estérifié

La majorité des acides gras libres (AGL) circulant dans le plasma sanguin est complexée à l'albumine. Ces AGL sont produits à partir du foie ou par hydrolyse des lipoprotéines par action de la lipoprotéine lipase (Bazinet et Layé, 2014). Le mécanisme de translocation des AG à travers les membranes plasmiques est discuté. Certains auteurs pensent qu'il s'agit d'une diffusion passive (Ouellet et al., 2009). D'autres sont en faveur d'un mécanisme facilité dépendant de protéines de transport spécialisées (Bonen et al., 2007).

I.4.1.1 Premier concept : la diffusion passive.

La lipophilie des AG est à l'origine du concept de leur diffusion passive à travers les membranes cellulaires (Kuhl et Spector, 1970). A la différence de substances polaires telles que les ions ou les sucres, les AG sont apolaires. Ils sont peu solubles dans l'eau et donc faiblement hydratés. Ils se dissolvent rapidement dans la partie apolaire des membranes (Noy et al., 1986 ; Spooner et al., 1990) et se répartissent entre les formes micellaires et les membranes biologiques. L'idée d'une entrée spontanée des AG dans les membranes émane donc des propriétés physico-chimiques des AG, des régions lipidiques membranaires et de l'eau. Ce concept de diffusion simple des AG, notamment du DHA, à travers les membranes cellulaires a fait l'objet de nombreuses études.

Concernant la diffusion passive du DHA sous sa forme non estérifiée à travers les cellules endothéliales de la BHE, Ouellet et al. (2009) ont utilisé une technique de perfusion cérébrale *in situ* chez des souris. Ils ont quantifié le coefficient de transport du DHA non estérifié marqué au carbone 14 à travers la BHE, étudié la saturabilité du transport du DHA et l'effet de la consommation chronique du DHA sur le coefficient de transport. Ils ont observé qu'un régime chronique en DHA sous sa forme non estérifiée diminue significativement son passage à travers la BHE alors que l'augmentation de la concentration du DHA dans le plasma ne diminue pas sa captation pendant une perfusion d'une minute. En effet, des mécanismes d'adaptation interviennent lors de l'exposition prolongée au DHA qui sera moins capté *via* la circulation sanguine. L'accumulation du DHA au niveau de la BHE altère sa diffusion. De fortes concentrations en DHA activent l'acyl-CoA synthétase qui piège les acides gras à l'intérieur du cytoplasme cellulaire ce qui permet de limiter le transport des acides gras à travers la BHE. A l'inverse, la suppression du DHA de l'alimentation augmente son coefficient d'incorporation dans les phospholipides cérébraux.

Le passage du DHA sous sa forme non estérifiée à travers la BHE peut être réalisé par un mouvement de « flip-flop » réversible. Le DHA se solubilise dans la membrane luminale des

cellules endothéliales et passe à travers cette dernière. Ce processus est répété à travers la membrane abluminale des cellules endothéliales de la barrière et les membranes plasmiques des autres cellules nerveuses (Hamilton et al., 2007).

I.4.1.2 Deuxième concept : un processus facilité

Le deuxième concept de transport du DHA au cerveau met en évidence une captation du DHA par les cellules *via* un processus facilité de transport à travers la BHE et impliquant des protéines membranaires cérébrales (Bonen et al., 2007). Parmi ces transporteurs, la BLBP (Brain Lipid Binding Protein) appartenant à la famille FABPpm (Plasma Membrane Fatty Acid Binding Protein) a été découverte dans le cerveau (Kurtz et al., 1994). Cette protéine présente une affinité élevée ($K_d = 10$ nM) spécifique pour le DHA mais pas pour l'AA ou l'acide palmitique (Xu et al., 1996). De même, la FATP (Fatty acid Transport Protein), exprimée dans diverses parties du cerveau au cours de l'embryogénèse cérébrale et durant la période postnatale, joue un rôle important dans le transport du DHA au cerveau (Utsunomiya et al., 1997). Le CD36 a aussi été cité comme transporteur potentiel du DHA dans le cerveau mais il semble être plutôt un transporteur des esters de cholestérols plutôt que des AG (Bazinet et Layé, 2014).

I.4.2 Transport du DHA estérifié dans une lysophosphatidylcholine

Des études ont montré que le DHA traverse la BHE sous une forme estérifiée dans une lysophosphatidylcholine (lysoPC). La captation de lysoPC plasmatiques par le cerveau avait été décrite par Portman et Illingworth (1974) chez le singe écureuil. Approximativement 1% des lysoPC sécrétées par le foie étaient captées par le cerveau et 70% des lysoPC captées étaient acylées directement en PC. Ces travaux ont été suivis par de nombreuses études.

In vivo, Thiès et al. (1994) ont montré que la forme circulante du DHA influençait son accrétion cérébrale, le DHA estérifié sous forme de lysoPC étant 8 à 10 fois mieux capté par le cerveau de rats que la forme non estérifiée correspondante. Les autres organes tels que le foie, les reins et le cœur favorisent la forme non estérifiée du DHA. La captation cérébrale de l'acide gras estérifié dans une lysoPC augmente avec le degré d'insaturation de ce dernier. Par exemple, la captation de d'une lysoPC-DHA est supérieure à celle d'une lysoPC-AA (Thiès et al., 1992).

Ces résultats *in vivo* ont été reproduits *in vitro* sur un modèle de coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins et d'astrocytes de rat. En utilisant ce modèle de BHE reconstituée, Bernoud et al. (1999) a pu confirmer le passage préférentiel de lysoPC-DHA comparativement à la forme non estérifiée à travers la BHE. Ces auteurs ont aussi montré que cette préférence implique la présence de transporteurs spécifiques, notamment des lipoprotéines à apolipoprotéines E principalement sécrétées par les astrocytes. La forme lysoPC-DHA est une forme physiologique circulante du DHA comme montré chez l'Homme et le rat (Croset et al., 2000) et s'observe notamment en réponse à l'ingestion de PC-DHA et de TG-DHA chez l'Homme (Brossard et al., 1997 ; Lemaître-Delaunay et al., 1999). Plus tard, Chen et Subbiah. (2007) ont confirmé le rôle potentiel de la lipase endothéliale dans la libération du DHA sous forme estérifiée en position *sn*-2 d'une lysoPC à travers la BHE, comme cité précédemment.

L'ensemble des travaux de recherches montre que la lysoPC-DHA est une forme spécifique et privilégiée de transport du DHA au cerveau. Confortant cette idée, Nguyen et al. (2014) ont mis en évidence le rôle important du transporteur orphelin Mfsd2a, exprimé exclusivement dans l'endothélium des micro-vaisseaux de la BHE, dans le transport du DHA. Selon des études *in vitro* et *in vivo* chez des souris Mfsd2a^{-/-}, ils ont démontré que Mfsd2a transporte le DHA sous forme

de lysoPC-DHA, mais pas le DHA sous forme non estérifiée, et que la forme zwitterionique de la phosphocholine dans la lysoPC est essentielle pour ce transport. De plus, des concentrations diminuées en DHA dans le cerveau de souris *Mfsd2a*^{-/-} ont été observées. Ceci est accompagné par une perte de cellules neuronales dans l'hippocampe et le cervelet. Concernant le mécanisme de passage de la lysoPC-DHA (liée à l'albumine) à travers la BHE en se liant au transporteur *Mfsd2a*, le complexe albumine-lipide est dissocié dans un premier temps puis la lysoPC-DHA s'adsorbe à la face luminale de la membrane plasmique des cellules endothéliales grâce au récepteur *Mfsd2a*. Le récepteur *Mfsd2a* lie la lysoPC-DHA et la transfère à travers la membrane abluminale à l'intérieur de la cellule. La lysoPC-DHA est ensuite transférée à l'intérieur du cerveau. La figure 18 illustre l'implication du transporteur *Mfsd2a* dans la captation cérébrale de la lysoPC-DHA (Betsholtz, 2014).

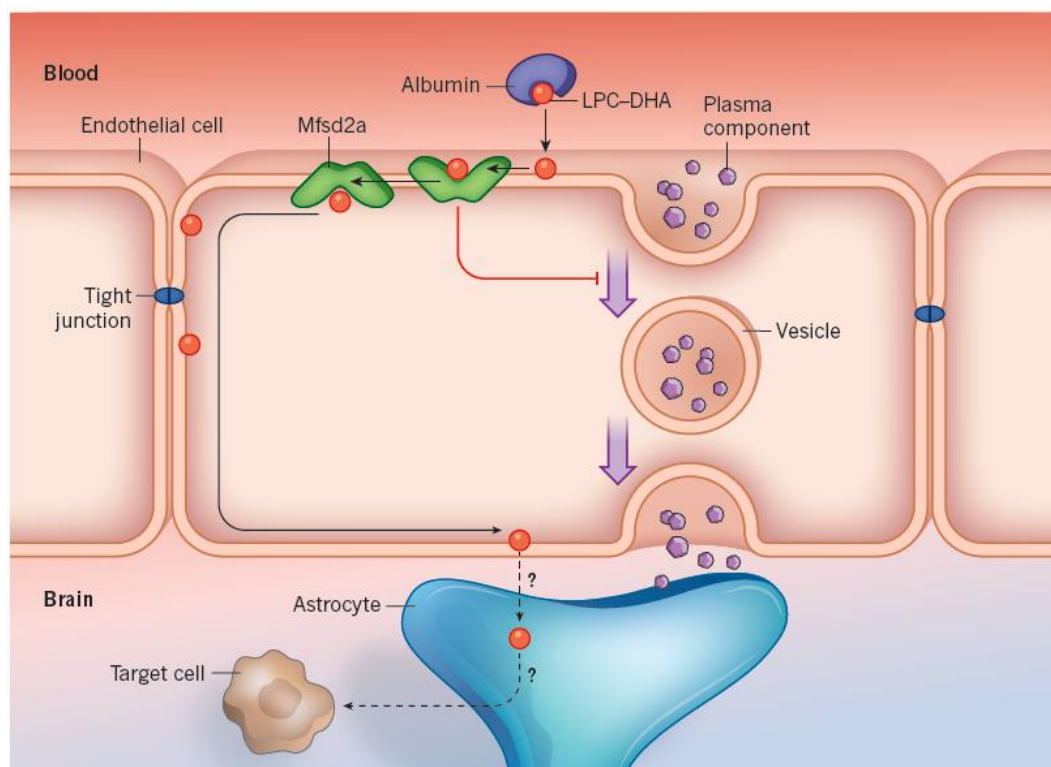


Figure 18: Implication du transporteur *Mfsd2a* dans la captation cérébrale de la lysoPC-DHA.

(Betsholtz, 2014)

Selon Bazinet et Layé (2014), les controverses qui existent actuellement pour expliquer le mode de transport du DHA au cerveau pourrait venir de la difficulté de mesure en temps réel des formes estérifiées et non estérifiées due au fait que la $\frac{1}{2}$ vie plasmatique des AGL dans le plasma n'est que de 30s *in vivo* et que leur estérification dans divers pools lipidiques peut être de 30min seulement. Ces auteurs ont proposé le schéma ci-dessous pour résumer le transport du DHA des pools plasmatiques au cerveau (figure 19).

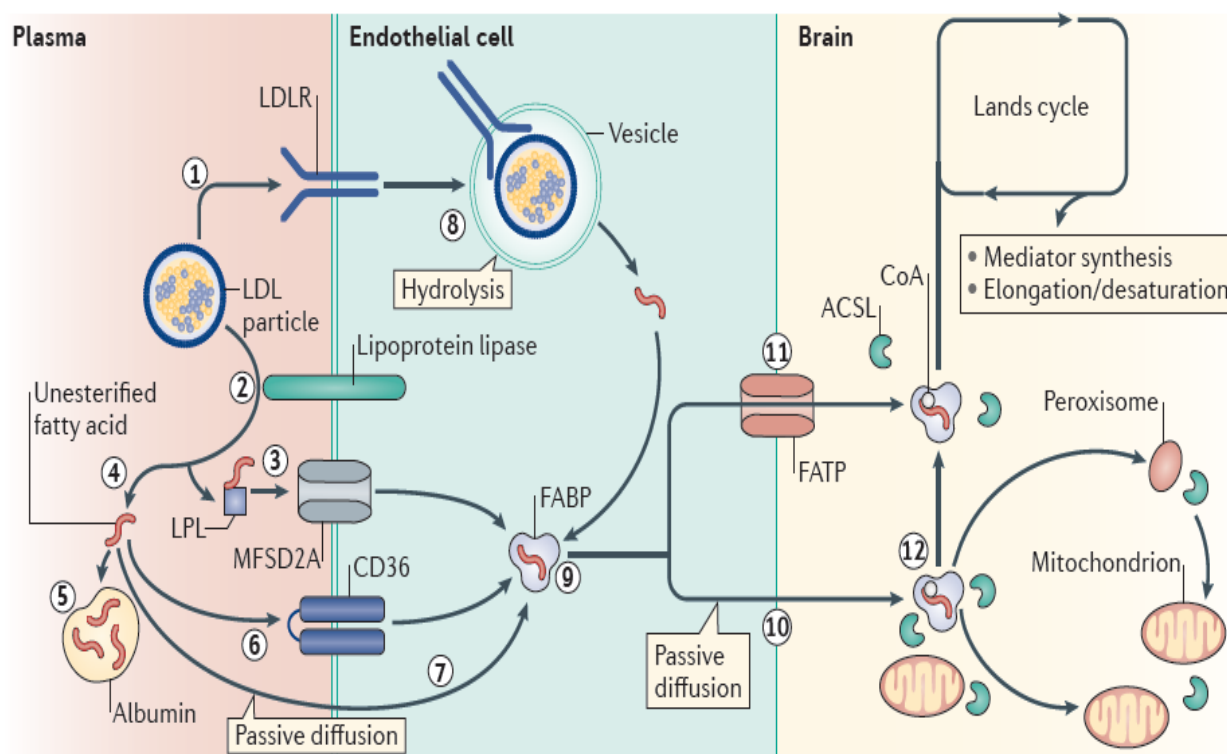


Figure 19: *Entrée des acides gras du plasma dans le cerveau.*

(Bazinet et Layé, 2014)

Ce schéma illustre les différentes formes de passage des AG plasmatiques (AG libre, lysophospholipide...) au cerveau et confirme bien l'ensemble des études antérieures que nous avons mentionnés tout au long de la partie '1.4 Passage du DHA à travers la barrière hémato-encéphalique'. Les différentes étapes impliquées dans ce passage sont :

1. Les lipoprotéines telles que les LDL, peuvent se lier à leurs récepteurs appropriés exprimés au niveau des cellules endothéliales, tel que le récepteur des LDL (LDLR), induisant une endocytose.
2. Alternativement, la lipoprotéine lipase peut interagir avec les lipoprotéines pour former un lysophospholipide (LPL) et un acide gras libre (AGL).
3. Le LPL formé se lie au transporteur orphelin Mfsd2a que nous avons précédemment cité.
4. L'AGL se retrouve dans le plasma.
5. L'AGL s'associe à l'albumine plasmatique.
6. Le complexe AGL-albumine est lié à la protéine CD36 exprimée au niveau des cellules endothéliales.
7. Le complexe AGL-albumine peut diffuser passivement à travers la membrane des cellules endothéliales.
8. Dans les cellules endothéliales, qui constituent la barrière hémato-encéphalique, les lipoprotéines peuvent être hydrolysées pour libérer les AGPI.
9. Les AGPI s'associent aux protéines FABP (Fatty acid Binding Protein).
10. Le complexe AGPI-FABP passe à travers la membrane neuronale par diffusion passive ou
11. Par l'intermédiaire des protéines FATP (Fatty acid Transport Protein).

12. Les AGPI, une fois dans le cerveau, subissent les mécanismes biochimiques décrits précédemment (cycle de Lands, oxygénation enzymatique et non-enzymatique, β -oxydation...).

Chapitre III: La Barrière Hémato-Encéphalique (BHE)

Le système nerveux central (SNC) est considéré comme une structure «supérieure» différente et isolée du reste de l'organisme. En effet, le cerveau est l'organe dont l'homéostasie est la plus strictement contrôlée pour échapper aux fluctuations périphériques et ceci par l'évolution d'un système de barrière contrôlant les échanges entre le cerveau et le sang. Cette barrière est nommée la barrière hémato-encéphalique (BHE).

I.1 Concept de barrière

Le concept de la BHE date des années 1885 lorsque Paul Erlich a injecté un colorant hydrosoluble dans le sang et a trouvé que ce colorant marquait tous les organes sauf le SNC (Erlich, 1885). Ensuite en 1913, Edwin Goldmann montre une coloration unique et totale du cerveau des lapins après injection directe de bleu de trypan dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Goldmann, 1913). Cette étude confirme la présence d'une barrière séparant le SNC de la circulation sanguine.

Le terme de « BHE » n'apparaît qu'un peu plus tard et sa localisation au niveau des capillaires cérébraux a été établie lorsque les jonctions serrées se trouvant entre les cellules endothéliales de ces capillaires ont été observées (Reese et Karnovsky, 1967).

La BHE, grâce à son rôle de filtre sélectif, est une interface dynamique qui maintient l'homéostasie cérébrale nécessaire au bon fonctionnement des neurones et des cellules gliales. Récemment, l'unité neuro-glio-vasculaire (UNGV) (figure 20) est définie comme une unité fonctionnelle composée de constituants cellulaires (cellules endothéliales, astrocytes, microglies, péricytes, myocytes, neurones) et de matrice extracellulaire (Muioio et al., 2014). La fonction cérébrale nécessite l'interaction entre les différents composants de cette unité.

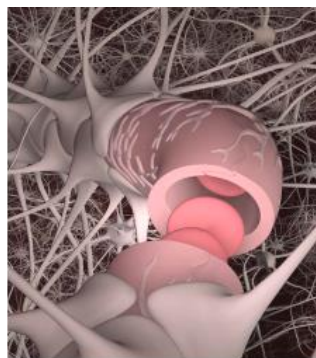


Figure 20: *Unité neuro-glio-vasculaire (UNGV).*

Elle est composée de cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux couverts par des péricytes avec lesquels elles partagent une membrane basale commune entourée par de nombreuses extensions de pieds astrocytaires.

(Wong et al., 2013).

L'ensemble de ces éléments (cellules endothéliales, membrane basale, péricytes et pieds astrocytaires) contribue à faire des capillaires cérébraux une barrière à la fois physique et métabolique qui régule les échanges entre le sang et le SNC, assurant le maintien de l'homéostasie cérébrale. Les propriétés structurales et métaboliques de la BHE font l'objet des parties suivantes.

I.2 La BHE: une barrière physique

I.2.1 Cellules endothéliales des capillaires cérébraux (CECC)

La fonction homéostatique de la BHE précédemment citée est assumée par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (CECC). L'endothélium des capillaires cérébraux constitue le principal support anatomique de la BHE ainsi que les astrocytes dont les pieds sont en association avec les cellules endothéliales.

Les CECC se caractérisent par une concentration en mitochondries importantes, présentent une activité de pinocytose minime et une absence de fenestrations (Oldendorf et al., 1977). Les jonctions cellules-cellules sont essentielles pour maintenir l'intégrité de la microvascularisation cérébrale et régler le transport paracellulaire. La restriction des échanges entre le sang et le cerveau est due aux caractéristiques structurales de l'endothélium des capillaires cérébraux comme la présence des jonctions serrées et des jonctions adhérentes entre ces cellules. Ces jonctions restreignent considérablement la diffusion des ions ainsi que le passage des molécules hydrophiles non électrolytes à travers la BHE (Oldendorf et al., 1977). L'ensemble de ces jonctions est représenté par la figure 21.

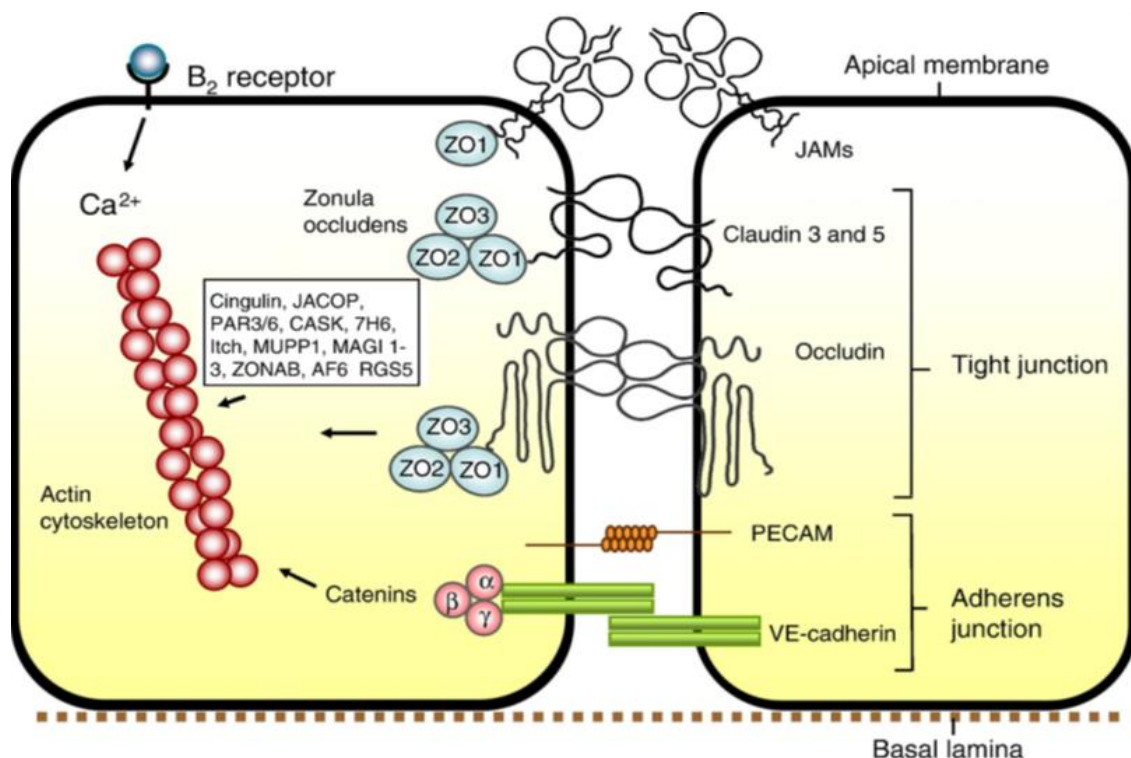


Figure 21: Les jonctions adhérentes et serrées au niveau des CECC.

(Abbott et al., 2010)

I.2.1.1 Jonctions Adhérentes

Les jonctions adhérentes sont présentes de manière ubiquitaire le long de l'arbre vasculaire et sont responsables de l'adhésion intercellulaire entre les cellules endothéliales adjacentes (Hawkins et Davis, 2005). Elles remplissent aussi de nombreuses fonctions comme la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine et la régulation de la signalisation intracellulaire.

Les jonctions adhérentes sont composées de cadhérine-5, encore appelée Vascular Endothelial (VE)-cadhérine (Dejana, 2004) et de caténines (Vorbrodt et Dobrogowska, 2003).

Cadhérine : la VE-cadhérine est exprimée par les cellules endothéliales partout dans le système vasculaire. Grâce à son domaine transmembranaire unique, elle assure l'adhésion cellule-cellule. Elle se lie par l'intermédiaire de sa terminaison carboxyle à la caténine cytoplasmique, et joue un rôle important dans la stabilisation des jonctions (Vestweber et al., 2009).

Caténines : elles représentent le lien permettant la communication entre les jonctions serrées et les jonctions adhérentes, mais également entre le complexe jonctionnel et le cytosquelette d'actine. En fait, les liaisons β -caténine-VE-cadhérine/ α -caténine induisent la liaison directe à l'actine (Oldendorf et al., 1977). La protéine p120 caténine interagit directement avec la VE-cadhérine et joue un rôle clé dans la perméabilité de la BHE.

I.2.1.2 Jonctions serrées

Les jonctions serrées des cellules endothéliales induisent la polarisation de ces dernières par la présence de deux parties distinctes, la face luminale face à la circulation sanguine, et le côté abluminal face au parenchyme cérébral.

Les jonctions serrées sont principalement responsables de la limitation de la perméabilité paracellulaire de la BHE (Hawkins et Davis, 2005). Elles sont constituées de protéines cytoplasmiques et transmembranaires (Furuse, 2010).

Parmi les protéines transmembranaires, citons les occludines, les claudines et les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM).

Les **occludines** ont été les premières décrites (Furuse et al., 1993). La localisation cellulaire de cette protéine de 65 kDa est directement liée à son degré de phosphorylation : les formes moins phosphorylées seront situées à la membrane basolatérale tandis que la forme la plus commune phosphorylée se concentrera uniquement sur les jonctions serrées (Sakakibara et al., 1997). Sa présence est corrélée à une augmentation de la résistance trans-endothéliale et une diminution de la perméabilité paracellulaire (Hirase et al., 1997).

Les **claudines**, une famille de 24 membres, ont des masses moléculaires allant de 21 à 28 kDa (Furuse, 2010). Elles ont quatre domaines transmembranaires portant à leur extrémité carboxy-terminale un domaine hautement homologue qui leur permet d'interagir avec plusieurs protéines cytoplasmiques telles que zonula occludens (ZO)-1, 2 et 3 (Itoh et Bissell, 2003).

Les claudines forment des dimères avec leurs homologues dans la cellule adjacente (Huber et al., 2001). Dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux de mammifères, les claudines-3, 5 et 12 sont exprimées avec une expression prédominante de la claudine-5 (Lippoldt et al., 2000). Les souris déficientes en claudine-5 sont caractérisées par une

augmentation de la perméabilité de la BHE à des petites molécules (<800 Da), montrant le rôle de cette protéine dans la restriction du passage paracellulaire (Nitta et al., 2003). La présence de la claudine-1 reste controversée; les claudines-10 et 22 ont été récemment identifiées dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux de souris (Ohtsuki et al., 2008).

Les **molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM)** appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Elles peuvent former des homo - ou hétérodimères, de part et d'autre des membranes des deux cellules adjacentes (Wolburg et Lippoldt, 2002).

Il s'agit de petites protéines (40 kDa) capables de se lier à la protéine ZO-1 et à l'occludine (Bazzoni et al., 2000). Les molécules d'adhésion jonctionnelle forment des jonctions intercellulaires qui réduisent la perméabilité paracellulaire et jouent un rôle important dans la formation des jonctions serrées et l'acquisition de la polarité cellulaire (Ebnet et al., 2004).

L'intégrité fonctionnelle de la BHE nécessite l'association de protéines transmembranaires avec les protéines localisées dans le cytoplasme des cellules endothéliales. Il s'agit notamment des guanylate kinases associées à la membrane ou membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) parmi elles, ZO-1, ZO-2 et ZO-3. Les protéines MAGUK sont nécessaires pour la classification des protéines des jonctions serrées à la membrane cellulaire (Gonzalez-Mariscal et al., 2003).

ZO-1, la première protéine identifiée à être directement associée à des complexes des jonctions serrées, est une phosphoprotéine de 222 kDa qui est exprimée à la fois dans les cellules endothéliales et épithéliales. ZO-1 liée aux jonctions serrées, comme l'occludine, permet de maintenir la stabilité et la fonction de ces jonctions (Fanning et al., 1998).

ZO-2, une phosphoprotéine de 160 kDa, est liée aux jonctions serrées et a également été détectée dans les tissus ne contenant pas des jonctions serrées. ZO-2 partage beaucoup de fonctions avec ZO-1 et peut agir au lieu de ZO-1 dans des conditions où les interactions ZO-1 et jonctions serrées sont perturbées. Dans une étude utilisant des clones de cellules épithéliales de souris qui n'avaient pas ZO-1, il y avait une régulation positive dans le recrutement de ZO-2 permettant une formation de jonctions serrées morphologiquement normales (Umeda et al., 2004).

ZO-3 est exprimée dans certains tissus contenant des jonctions serrées ; Toutefois, son rôle au niveau du maintien de l'intégrité de la BHE n'a pas été élucidé (Inoko et al., 2003).

Outre la présence des jonctions entre les cellules endothéliales de la BHE, le transfert des molécules à travers la BHE est limité par une barrière métabolique, formée par des enzymes capables de métaboliser des composés endogènes. Ces enzymes restreignent aussi le passage de molécules du compartiment sanguin au compartiment cérébral.

I.3 La BHE: une barrière métabolique

Les enzymes et les pompes d'efflux constituent la barrière métabolique. Elles limitent la pénétration de nombreux composés au cerveau (Decleves et al., 2011 ; Begley, 2004).

I.3.1 Les enzymes

I.3.1.1 Monoamine oxydases (MAOs):

Les monoamine oxydases (MAO-A et MAO-B) sont des enzymes présentes dans les mitochondries des tissus du cerveau (Lai et al., 1975). Les MAO-A sont présentes dans l'endothélium cérébral (Konradi et al., 1987). Elles dégradent les neurotransmetteurs monoaminergiques (dopamine, sérotonine, noradrénaline, adrénaline) libérés par les neurones. Elles empêchent également le passage de leurs précurseurs (le 5-hydroxytryptophane et la 3,4-dihydroxyphénylalanine) du sang vers le cerveau (Lai et al., 1975).

I.3.1.2 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT)

La γ -glutamyl transférase ou transpeptidase (γ -GT) est une enzyme des cellules endothéliales de la BHE (Meyer et al., 1990). On la trouve aussi dans les péricytes (Frey et al., 1991) qui représentent la source majeure de cette enzyme dans les capillaires cérébraux (Risau et al., 1992). Elle catalyse le transfert du résidu γ -glutamyl peptide à partir d'un donneur (principalement du glutathion) à un accepteur. Elle est associée au transport de certains acides aminés à travers la BHE. En outre, elle a été décrite comme un agent neuroprotecteur car son activité enzymatique lutte contre l'invasion cérébrale des leucotriènes C4. Ainsi, elle permet de maintenir une faible perméabilité de la BHE (Black et al., 1994).

I.3.1.3 Phosphatase alcaline

Cette enzyme hydrolyse les métabolites phosphorylés et assure le transport des esters de phosphate et des ions phosphate (Meyer et al., 1990). Elle est particulièrement abondante dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Lawrenson et al., 1999 ; Meyer et al., 1990).

I.3.1.4 Enzymes de détoxification

D'autres enzymes telles que les cytochromes P450 monooxygénases, les NADPH-cytochrome P450-réductases, les glucurosyl transférases, les glutathion peroxydases et les époxydes hydrolases sont impliquées dans la détoxification de la BHE (Gherzi-Egea et al., 1995). Ces enzymes, qui sont principalement exprimées dans les plexus choroïdes, sont responsables de la dégradation des xénobiotiques. En plus des enzymes mentionnées ci-dessus, l'endothélium de la BHE a une protection supplémentaire suite à l'expression de la membrane cérébrale des transporteurs d'efflux.

I.3.2 Les pompes d'efflux

Les pompes d'efflux sont des protéines impliquées dans le transport actif des molécules endogènes et exogènes au niveau du cerveau. Elles offrent une protection du SNC en contrôlant l'entrée ou la libération de molécules potentiellement toxiques dans le cerveau (Cordon-Cardo et al., 1989). Elles comprennent de nombreuses familles et sous-familles, parmi lesquelles la famille des transporteurs ATP-binding cassette (ABC) et la P-glycoprotéine.

I.3.2.1 Les transporteurs ATP-Binding Cassette (ABC)

La superfamille de transporteur « ATP-binding cassette » (ABC) est une des plus grandes familles de protéines connues. Cette superfamille de transporteur est formée de 48 gènes, répartis en 7 sous-familles différentes nommées de A à G (Kaminski et al., 2006). Diverses fonctions physiologiques, telles que l'entretien de bicouches lipidiques, le transport des peptides et le transport des stérols sont assurées par les transporteurs ABC. Ils contribuent principalement au développement de la multirésistance (MDR) (Gottesman et al., 1995).

Une protéine est classée en tant que membre de la famille ABC lorsqu'elle possède un domaine ATP-binding cassette. Ces domaines sont distinctifs et conservés au sein de la famille des transporteurs ABC. L'unité fonctionnelle d'un transporteur entier ABC, comme le transporteur ABCB1 (figure 22, A), contient deux domaines transmembranaires (TMD) (TransMembrane Domain) et deux domaines cytoplasmiques (NBD) (Nucleotide-Binding Domain). Les hémi-transporteurs, comme le transporteur ABCG2 (figure 22, B), comportent un domaine TMD et un domaine NBD (Hyde et al., 1990).

La sous-famille ABCA est impliquée dans le transport des PL et du cholestérol dans les membranes plasmiques (Kaminski et al., 2006). Un déficit de ces transporteurs peut développer une dyslipidémie chez les personnes touchées. ABCA1 joue notamment un rôle important dans le transport inverse du cholestérol et sa mutation conduit à la maladie de Tangier, qui est un trouble autosomique récessif caractérisé par une déficience en lipoprotéines à haute densité (HDL), une déficience en apolipoprotéine AI et l'accumulation d'esters de cholestérol dans le corps (Santamarina-Fojo et al., 2001).

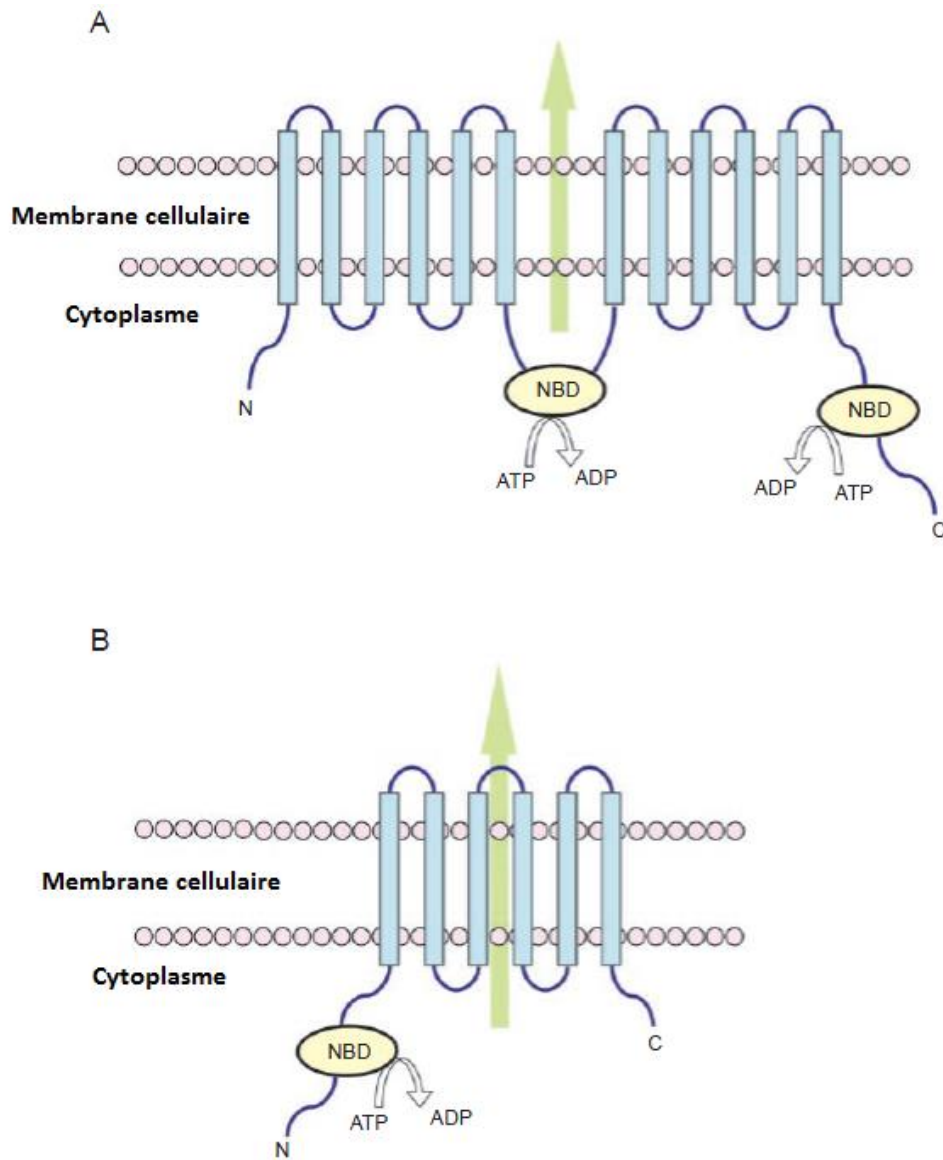


Figure 22: *Les transporteurs ABC.*

(A) ABCB1 est un transporteur entier. (B) ABCG2 est un hémi-transporteur.

(d'après Lin et al., 2006).

I.3.2.2 La P-glycoprotéine (P-gp)

La P-glycoprotéine (P-gp) a été décrite pour la première fois dans les cellules endothéliales de la BHE humaine (Cordon-Cardo et al., 1989). Cette protéine, de poids moléculaire 140 à 180 kDa, est une pompe d'efflux largement distribuée dans les organes et les tissus (Cordon-Cardo et al., 1989 ; Staud et al., 2010 ; Schlachetzki et Pardridge, 2003).

La P-gp a deux domaines transmembranaires (TMD) et deux domaines de liaison de nucléotides (NBD). Les sites de glycosylation (SG) sont situés sur la première boucle extracellulaire. Les molécules d'adénosine tri-phosphate (ATP) lient NBD au milieu (figure 23).

Il existe deux types de P-gp chez l'Homme: la P-gp de type I, codée par le gène MDR1 (Multi Drug-Resistance 1) responsable du phénotype de résistance aux médicaments et de l'efflux de molécules à travers la BHE; la P-gp de type II, une phosphatidylcholine translocase codée par le gène MDR2, exprimée dans les hépatocytes.

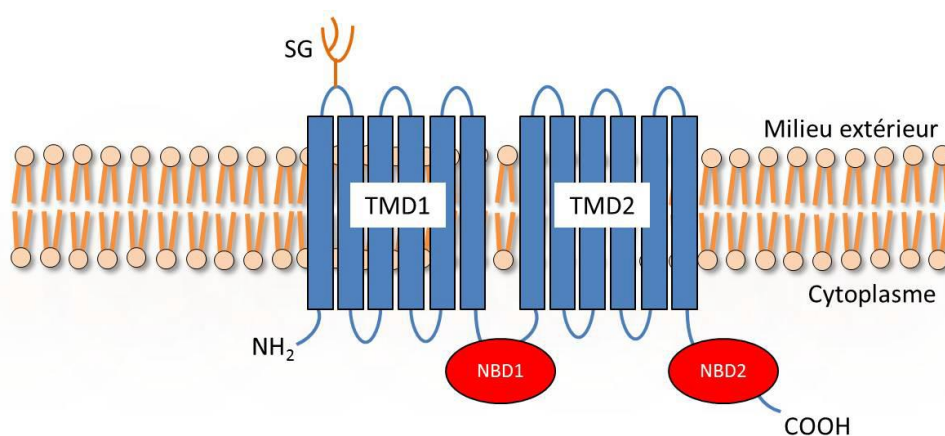


Figure 23: Structure de P-gp humain au sein de la membrane plasmique.

(d'après Vautier et al., 2006)

Une des caractéristiques de la P-gp est la variété de substrats qui diffèrent par leur structure chimique, leur masse moléculaire et leur mécanisme d'action pharmacologique (Vautier et al., 2006).

Chez les souris dépourvues de P-gp, la pénétration dans le cerveau des substrats de la P-gp peut être augmentée de 10 à 100 fois, ce qui démontre le rôle important de cette pompe efflux dans la protection du système nerveux central (Schinkel et Jonker, 2003). L'expression de la P-gp est influencée par l'environnement de la cellule car elle est renforcée dans les cellules endothéliales par co-culture avec des cellules gliales (Fenart et al., 1998). Cependant, l'emplacement précis de la gp-P dans les capillaires du cerveau a été longtemps débattu. Certains auteurs ont proposé qu'elle était principalement exprimée dans la surface luminale des cellules endothéliales (Czeredys et al., 2008). D'autres études ont démontré une expression fonctionnelle de la P-gp dans des cultures primaires d'astrocytes (Decleves et al., 2000 ; Ronaldson et al., 2004).

I.4 Induction des propriétés de la BHE par les astrocytes

Morphologiquement, les astrocytes sont généralement des cellules étoilées avec un diamètre de l'ordre de 140µm dans le cerveau humain (Oberheim et al., 2009). Les astrocytes interagissent avec les cellules endothéliales des capillaires cérébraux à travers les pieds astrocytaires qui s'enroulent autour des capillaires (Abbott et al., 2006) (figure 24). Un astrocyte peut communiquer avec plusieurs capillaires (Oberheim et al., 2009).

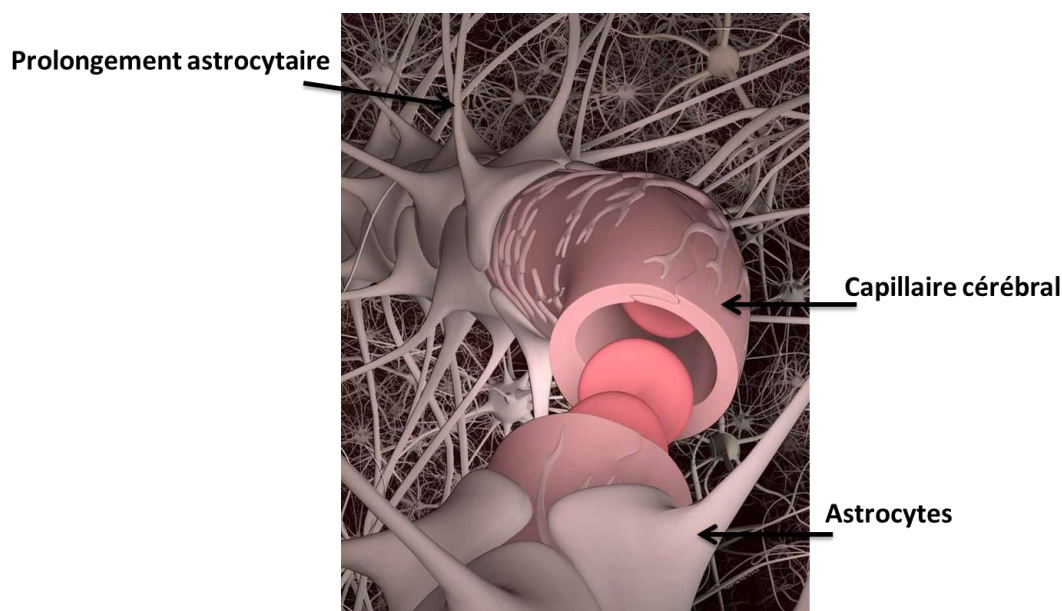


Figure 24: *Forme et densité des pieds astrocytaires en contact avec le capillaire cérébral.*

(d'après Wong et al., 2013).

Delorme et al. (1968) et Wolff et Bar (1972) étaient les premiers à constater la formation des pieds astrocytaires au cours du développement de la BHE. Ensuite, DeBault (1981) et DeBault et Cancilla (1980) ont cocultivé des cellules endothéliales cérébrales et des cellules gliales et ont montré une augmentation de l'activité G-glutamyl transférase par rapport à des cellules endothéliales cultivées seules. Un peu plus tard, Janzer et Raff (1987) ont inoculé des astrocytes de rat nouveaux nés dans l'œil d'un rat adulte et ont montré que, deux semaines plus tard, des vaisseaux ayant les caractéristiques d'une BHE se formaient avec présence des jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales.

Les astrocytes sont impliqués dans de multiples processus au niveau du cerveau comme la régulation des concentrations en eau et en ions, la prolifération des cellules souches, le contrôle du nombre des synapses et l'induction des propriétés de la BHE (Volterra et Meldolesi, 2005 ; Freeman, 2010 ; Halassa et Haydon, 2010 ; Ullian et al., 2001 ; Lee et al., 2003 ; Abbott et al., 2006 ; Tao-Cheng et al., 1987). De nombreuses études ont permis de montrer le rôle crucial des astrocytes dans la différenciation et le maintien de la BHE, en renforçant les jonctions serrées (Dehouck et al., 1990 ; Wolburg et al., 1994), ou encore l'expression de pompes d'efflux comme la P-gp et certaines MRPs (Berezowski et al., 2004). Plusieurs facteurs dérivés des astrocytes, y compris les facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales (GDNF), le facteur de croissance des fibroblastes (bFGF), et l'angiopoïétine-1 (ANG-1) sont connus pour induire les caractéristiques de la BHE (Abbott et al., 2006). L'ensemble de ces études évoquent un rôle des astrocytes dans l'induction des propriétés de la BHE.

Chapitre IV: Phospholipide structuré à DHA : AceDoPC

I.1 Intérêt d'un nouveau phospholipide structuré « AceDoPC »

Divers travaux cités précédemment ont montré que les lysoPC constituent une forme d'apport efficace de DHA au cerveau. Ces travaux ont été très récemment confortés par la mise en évidence dans les cellules endothéliales de souris du récepteur Mfsd2a identifié dans le cerveau comme un transporteur endogène du DHA sous forme de lysoPC.

Dans la molécule de lysoPC, le DHA migre facilement de la position *sn*-2 à la position *sn*-1 qui est favorisée. Or, physiologiquement le DHA est estérifié en position 2 des PL. Pour assurer sa position physiologique, Lagarde et al. ont synthétisé un phospholipide structuré possédant un groupement acétyle en position *sn*-1. De ce fait, la molécule ayant une plus grande stabilité et prévenant l'isomérisation garde une polarité proche de celle de lysoPC-DHA (Polette et al., 1999). Les auteurs ont considéré que les estérases cérébrales pouvaient facilement hydrolyser le groupement acétate pour ensuite redonner la lysoPC-DHA. Cette molécule a été nommée AceDoPC (figure 25) (Lagarde et al., 06.09929).

Les premières études concernant l'AceDoPC ont pu être réalisées grâce à la production de la molécule par un procédé enzymatique en une seule étape limitant ainsi l'isomérisation de l'acide gras pendant la synthèse. Ce procédé consiste en une réaction de transestérification par une enzyme immobilisée à partir d'une PC-DHA comme substrat produite par une biomasse marine issue d'une microalgue. En effet, la microalgue hétérotrophe *Cryptocodinium cohnii* a une composition en AG particulière notamment en AGPI puisqu'elle ne comporte que du DHA qui représente 30 à 50% des AG des PL (Harrington et Holz, 1968) ; aucun autre AGPI n'est supérieur à 1%.

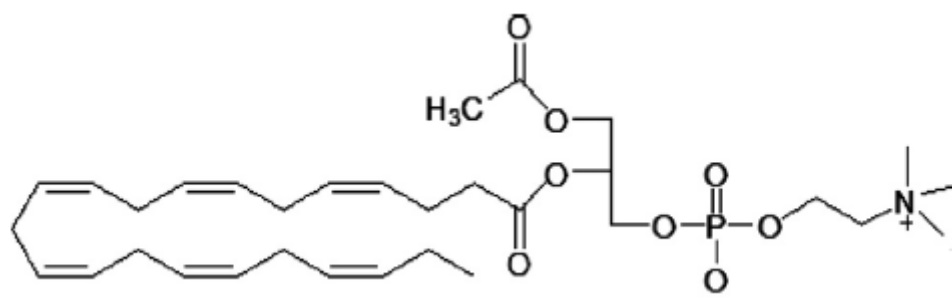


Figure 25: Structure de la 1-acétyl,2-docosahexaénoyl-glycérophosphocholine (AceDoPC).

I.2 Propriétés biologiques de l'AceDoPC

I.2.1 Effet de l'AceDoPC sur l'ischémie cérébrale chez le rat

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la troisième cause de mortalité et la principale cause de handicap dans les pays occidentaux. La recanalisation artérielle par thrombolyse intraveineuse demeure la seule thérapeutique validée mais reste d'accès difficile pour la majorité des malades. Il existe ainsi un réel besoin de développer des stratégies de neuroprotection complémentaires.

Comme il a été détaillé précédemment, le DHA a été impliqué dans de multiples voies de neuroprotection. On sait que l'ischémie cérébrale s'accompagne d'une libération rapide d'AG libres, en particulier d'AA, depuis les PL membranaires sous l'action de la PLA₂. L'accumulation de l'AA et de ses métabolites peut être neurotoxique. Ainsi, l'atténuation de la libération d'AA pourrait avoir un effet neuroprotecteur. Le DHA peut diminuer le contenu membranaire en AA car les AGPI n-3 sont en compétition avec l'AA pour l'estérification dans les PL.

Les AGPI n-3 présentent un effet neuroprotecteur durant la phase aigüe de l'ischémie cérébrale. Une importante réduction du volume de l'infarctus dans un modèle de rats ayant subi une occlusion intraluminale cérébrale moyenne a été observée chez les rats traités par voie intraveineuse avec du DHA associé à l'albumine. L'action neuroprotectrice s'est accompagnée d'une importante accumulation de neuroprotectine D1 (Belayev et al., 2005). L'effet neuroprotecteur peut être dû aussi à la capacité du DHA à franchir la BHE.

Suite à l'hypothèse d'une meilleure incorporation cérébrale du DHA estérifié dans l'AceDoPC et donc d'une meilleure neuroprotection, il était intéressant de comparer in vivo par imagerie par résonance magnétique (IRM), le rôle neuroprotecteur de l'AceDoPC et du DHA administrés par voie intraveineuse durant la phase aigüe d'une ischémie cérébrale focale dans un modèle murin (Chauveau et al., 2011). L'AceDoPC injectée 1 heure après l'induction de l'ischémie carotidienne à la dose de 1,7 mg/kg diminue la taille des lésions (34%) de façon significative alors que le DHA est moins actif (17%). De plus, les neuroscores sont plus faibles avec l'AceDoPC qu'avec les autres groupes (DHA, contrôle). Une approche du mécanisme impliqué dans cette production a été recherchée en évaluant le stress oxydant associé à l'ischémie cérébrale. Pour cela, la production d'un marqueur reconnu du stress, la 8-epi PGF2 α , un des isoprostanes principaux, a été mesurée dans le cerveau après ischémie et traitement. Les quantités d'isoprostanes mesurées sont corrélées avec la taille des lésions et significativement diminuées dans les groupes DHA et AceDoPC comparativement aux groupes témoins.

Ces résultats ont montré l'effet neuroprotecteur du DHA estérifié dans l'AceDoPC dans un modèle d'ischémie cérébrale.

I.2.2 Effet Anti-PAF de l'AceDoPC

Le facteur d'activation des plaquettes (PAF) est une glycérophosphocholine possédant un éther à chaîne alkyle en position *sn-1* du glycérol et un groupement acétate en position *sn-2* (Vargaftig et al., 1981). En plus de l'agrégation des plaquettes sanguines, le PAF est reconnu comme une molécule pro-inflammatoire (Larsen et Henson, 1983) ainsi que comme un agent de broncho-constriction (McManus et Deavers, 1989).

La structure chimique de l'AceDoPC peut s'apparenter à celle du PAF puisqu'il possède le même groupement acétate mais en position *sn-1*. Ceci a conduit à penser que cette molécule pourrait être un modulateur de l'activité du PAF.

En utilisant des plaquettes sanguines humaines comme modèle d'agrégation induite par le PAF, Lagarde et al. ont pu montrer que l'AceDoPC inhibait cette agrégation avec un IC₅₀ de 10 μ M tandis qu'à 1 μ M était observée une inhibition de 15% (Lagarde et al., 11.58149) (figure 26).

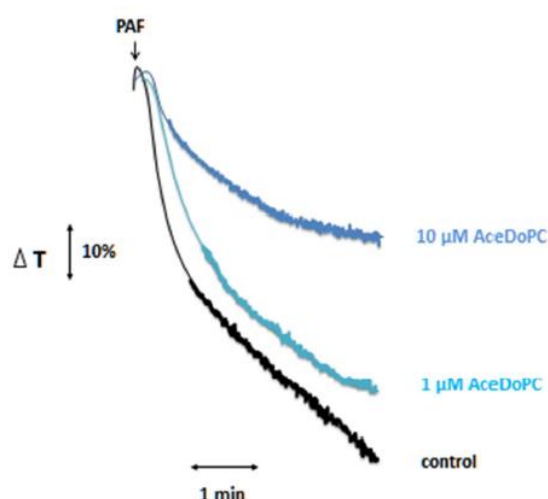


Figure 26: *Effet anti-PAF de l'AceDoPC.*

(Lagarde et al., 11.58149)

Cette inhibition peut refléter le potentiel anti-inflammatoire de l'AceDoPC.

I.2.3 Comportement de l'AceDoPC dans le sang humain

L'AceDoPC comme la lysoPC, pourrait être un mode de transport privilégié du DHA au cerveau. Se comporte-t-il différemment d'un phospholipide dans la circulation sanguine ? Pour répondre à cette question, sa distribution dans les divers compartiments sanguins humains a été comparée à celle d'une PC-DHA. L'équipe de Lagarde a utilisé les deux lipides radioactifs (PC-DHA et AceDoPC, marquées sur le DHA). La mesure de la radioactivité a été réalisée dans les plaquettes, les globules rouges et le plasma (Lagarde et al., 2015). C'est ainsi qu'une incorporation rapide et plus importante a été mise en évidence dans les globules rouges du sang incubé avec l'AceDoPC comparativement à la PC-DHA, ce qui n'a pas été observé dans les plaquettes. Or, il est généralement admis que les globules rouges sont un index de l'accrétion du DHA au cerveau (Fleith et Clandinin, 2005).

Dans le plasma, la distribution de l'AceDoPC et de la PC-DHA dans les différents transporteurs a été analysée et a montré que l'AceDoPC est liée préférentiellement à l'albumine comme cela a été rapporté pour la lysoPC-DHA (Croset et al., 2000) et pour une moindre part aux lipoprotéines, spécifiquement aux HDL. La PC-DHA est principalement liée aux lipoprotéines (HDL, LDL et VLDL) et très peu à l'albumine.

Ces résultats suggèrent que l'AceDoPC se comporte comme une lysoPC plutôt qu'une PC.

I.3 Etude du métabolisme compartimental chez l'Homme

Une étude préliminaire a été réalisée chez l'Homme pour étudier l'incorporation cellulaire et cérébrale du DHA au cours du temps (résultats non publiés). Pour cela, le ^{13}C -DHA a été tracé après une ingestion d'AceDoPC chez un volontaire sain. Une comparaison avec de la ^3C -PC-DHA et du ^{13}C -TG-DHA a été faite chez deux autres volontaires.

L'étude de la distribution du ^{13}C -DHA dans plusieurs lipides de divers compartiments sanguins (plasma, plaquettes et globules rouges) en fonction du temps a montré des cinétiques proches à partir de TG-DHA et PC-DHA mais différente à partir d'AceDoPC.

Une accumulation de ^{13}C -lysoPC-DHA dans les globules rouges plus importante a été observée à partir d'AceDoPC qu'à partir des deux autres sources.

L'ensemble des résultats de l'étude pilote permet de faire l'hypothèse que l'AceDoPC pourrait se comporter comme la lysoPC. Ces résultats préliminaires seront à confirmer grâce à la réalisation de l'étude complète. Cette étude est en cours et a lieu dans une population humaine de 60 à 70 ans, sans atteinte cognitive (voir Annexe).

MATERIELS ET METHODES

Chapitre 1: Matériels

I.1 Produits & fournisseurs

1. Matériel pour les synthèses chimiques :

Bachem : sn-glycérophosphocholine.

Bioactif : [1-¹⁴C]acide docosahexaénoïque (56,7 mCi/mmol).

CarloErba : chloroforme, éthanol, méthanol, éther diéthylique.

Macherey-Nagel : Chromabond Cartouches Silanol.

Merck : Plaques de chromatographie sur couche mince (Silica gel 60G, 200x200x0,25 mm).

Perkin Elmer : Pico fluor TM15.

Sigma Aldrich : acide docosahexaénoïque, 1-palmitoyl,2-lysophosphatidylcholine, lipase *Candida antarctica* immobilisée (Novozym 435), 4-diméthylaminopyridine, N-N-diméthylformamide, N-N- dicyclohexylcarboxydiimide, acide phosphomolybdique, acétate de vinyle, t-butanol, pentoxyde de phosphore.

2. Matériel pour le modèle de BHE *in vitro* :

Costar : Transwell (0,4µM, membrane de polycarbonate), boîtes de culture 60 mm, scraper.

Gibco life technologies : Milieu de culture « Dulbecco's Modified Eagle Medium ».

Hyclone laboratories : Sérum de veau fœtal et sérum de cheval.

Merk : Glutamine.

Nunclon : Boîtes multipuits.

Seromed : Gentamycine, trypsine.

Sigma : bFGF

3. Matériel pour les analyses lipidiques et les dosages :

Sigma : Phosphatidyléthanoline, phosphatidylcholine, triglycérides, esters de cholestérol, hydroxytoluène butylé.

Fluka Chemica : méthylamine à 40% dans l'eau.

Biomérieux : Kit Cholestérol RTU, Triglycéride PAP 150, Albumine.

I.2 Appareils

- *GR 4.11, Jouan* : Centrifugeuse.
- *Rotavapor RE11, Büchi 461 Water Bath* : Evaporateur rotatif.
- *Bioblock Scientific* : Incubateur.
- *HANNA pH 210* : pH-mètre.
- *Berthold*: Ray test automatic TLC-linear analyzer.
- *Packard T2100* : Compteur de radioactivité bêta.
- *Biorad* : Système chromatographique FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).
- *Amersham Biosciences* : Colonne Superose 6 10 X 300-mm GL.
- *IKA Labortechnik Staufen* : Polytron ultra-turrax T8.
- Lecteurs de plaque ELISA.
- *Storm 820, Amersham* : phosphor-imageur
- *Fuji Film* : film-sensitive phosphor screen BAS-TR2025

Chapitre 2 : Méthodes

I.1 Synthèse de phospholipides structurés à DHA

I.1.1 Synthèse de 1-acétyl,2- ^{14}C docosahexaénoyl-glycérophosphocholine ou ^{14}C -AceDoPC

Le procédé de synthèse de l'AceDoPC non radioactif à partir d'une biomasse a été breveté par le laboratoire (Lagarde et al., 06.09929). Pour réaliser la synthèse radioactive, le procédé a été modifié selon le schéma ci-dessous (figure 27). Cette synthèse se fait à partir de sn-glycérophosphocholine (GPC) et de DHA marqué au carbone 14 suivant deux étapes.

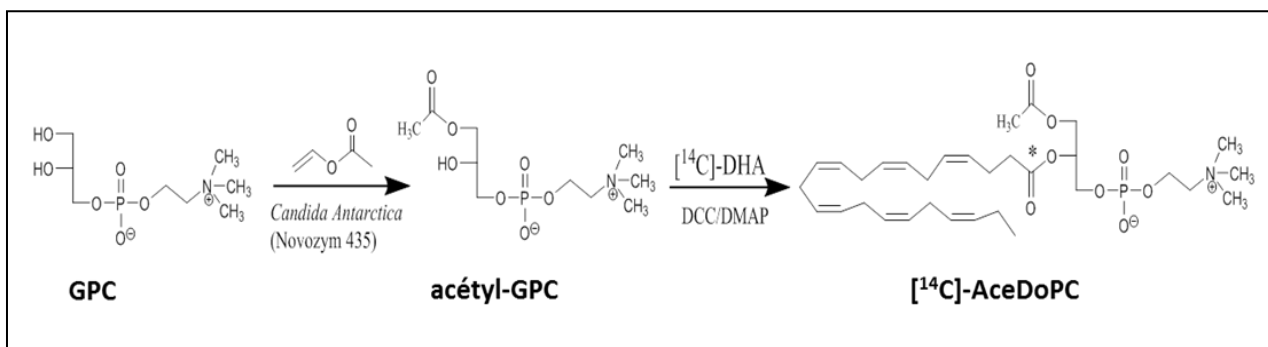


Figure 27: Schéma de synthèse de l' ^{14}C -AceDoPC.

La première étape de la synthèse consiste dans l'acétylation sélective de la position *sn-1* de la GPC. La 1-acétyl-GPC est formée à partir de la GPC commerciale par action de la lipase immobilisée *Candida Antarctica* (Virto et Adlercreutz, 2000). Cette lipase est connue pour acyler spécifiquement les fonctions alcools primaires en présence d'un ester. La réaction d'acétylation se fait sous agitation à température ambiante. En plus de l'enzyme immobilisée, cette réaction nécessite la présence d'un donneur d'acétate comme l'acétate de vinyle, de l'eau nécessaire pour l'activité enzymatique et un solvant, le t-butanol. La GPC (4,6 μmoles) est dissoute dans l'eau (16 μl), puis sont ajoutés l'enzyme (8,74 mg), l'acétate de vinyle (1,83 mmol) et le t-butanol (97 μl). Le mélange est agité pendant 48 heures, puis la lipase est séparée du mélange par filtration et lavée au méthanol. L'addition d'éther diéthylique au mélange permet de précipiter la 1-acétyl-GPC. La formation de la 1-acétyl-GPC ainsi synthétisée est contrôlée par chromatographie sur couche mince (CCM). Le solvant de migration utilisé est le mélange chloroforme/méthanol/eau (65/25/4, v/v/v). La révélation de la plaque CCM se fait par pulvérisation du réactif de Dragendorff spécifique pour la détection amines quaternaires. Le rendement de la réaction d'acétylation de la GPC est de 73%.

La deuxième étape de la synthèse consiste à acyler la 1-acétyl-GPC avec du ^{14}C -DHA (Siddiqui et al., 2005). Cette réaction a lieu sous agitation, à température ambiante, à l'abri de la lumière, en milieu anhydre et en présence d'un agent antioxydant (hydroxytoluène butylé : BHT) afin d'éviter l'oxydation du DHA. Le chloroforme utilisé est préalablement séché par

distillation sur pentoxyde de phosphore (P_2O_5). La 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et la 4-(diméthylamino)pyridine (DMAP) sont séchées sous vide dans un dessiccateur en présence de P_2O_5 pendant 4 heures. Du $[^{14}C]$ -DHA (56,7mCi/mmol ; 20 μ Ci) et du DHA non marqué (10 μ moles) sont dissous dans 200 μ l de chloroforme anhydre. Au 1-acétyl-GPC (3,36 μ moles) préalablement lyophilisé une nuit puis dissous dans 7,5 μ l du N,N,diméthylformamide (DMF) anhydre est ajouté du DMAP (5,04 μ moles). Le mélange DHA + $[^{14}C]$ -DHA est additionné au tube contenant la 1-acétyl-GPC. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 heures. L'anhydride de DHA est formé à partir du DHA et de la DCC (16,8 μ moles) (agent réticulant favorisant la formation de l'anhydride d'acide). La dicyclohexylurée (DCU) formée au cours de la réaction est filtrée. La formation de l'AceDoPC est suivie par CCM d'une prise aliquote en utilisant le système de solvants chloroforme/méthanol/eau (65/25/4, v/v/v) et en révélant les plaques par le réactif phosphomolybdique.

Le résidu obtenu est purifié par extraction en phase solide (SPE) utilisant une colonne de silice Chromabond SiOH (Macherey-Nagel) et un gradient de solvant formé de chloroforme et de méthanol. L'AceDoPC formée est éluée aux proportions chloroforme/méthanol (70:30, v/v). Le rendement de la réaction d'acylation est de 55%.

L' $[^{14}C]$ -AceDoPC synthétisée sera utilisée pour réaliser l'étude *in vitro* de passage du DHA sous différentes formes à travers un modèle de BHE ainsi que l'étude *in vivo* de captation cérébrale du DHA estérifié ou non chez le rat.

I.1.1.1 Vérification de la pureté de l'AceDoPC synthétisée

Radiochromatographie sur couche mince :

La radioactivité du $[^{14}C]$ -AceDoPC est déterminée par scintillation liquide et sa pureté est vérifiée au lecteur de plaques radioactives (98%) (figure 28).

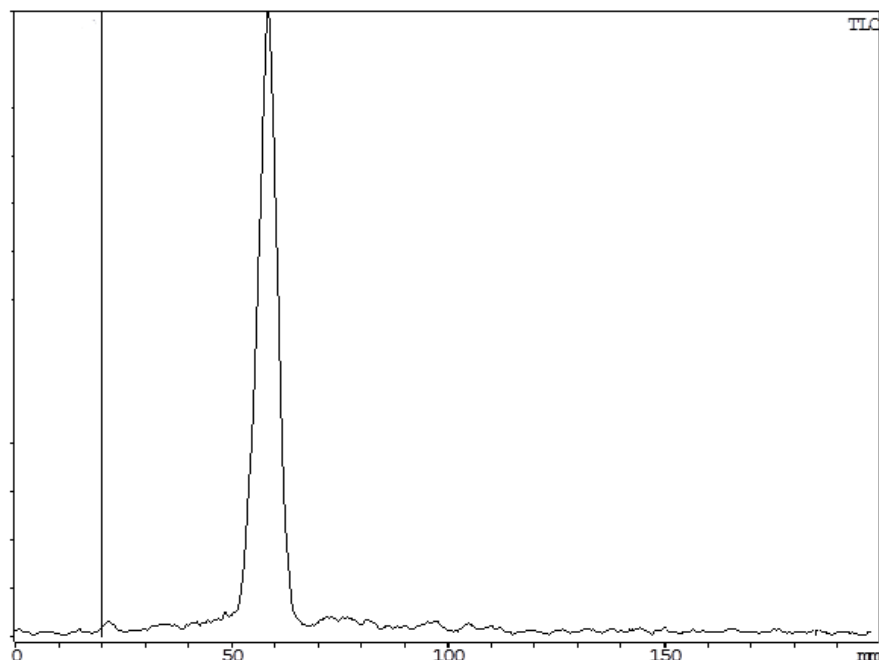


Figure 28: Détermination par radiochromatographie en couche mince de la pureté radioactive de l' $[^{14}C]$ -AceDoPC.

Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) analytique :

La synthèse de l'AceDoPC est suivie aussi par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) analytique en phase inverse (colonne C18 X-Bridge) en utilisant un gradient de solvant méthanol/eau/acétonitrile (solvant A : 95/35/2,5 ; solvant B : 100/4/2,5, v/v/v). Le débit de la phase mobile est 1ml/min. L'AceDoPC est détectée à 205 nm après 27 min. La figure 29 représente le chromatogramme montrant la pureté de l'AceDoPC formée.

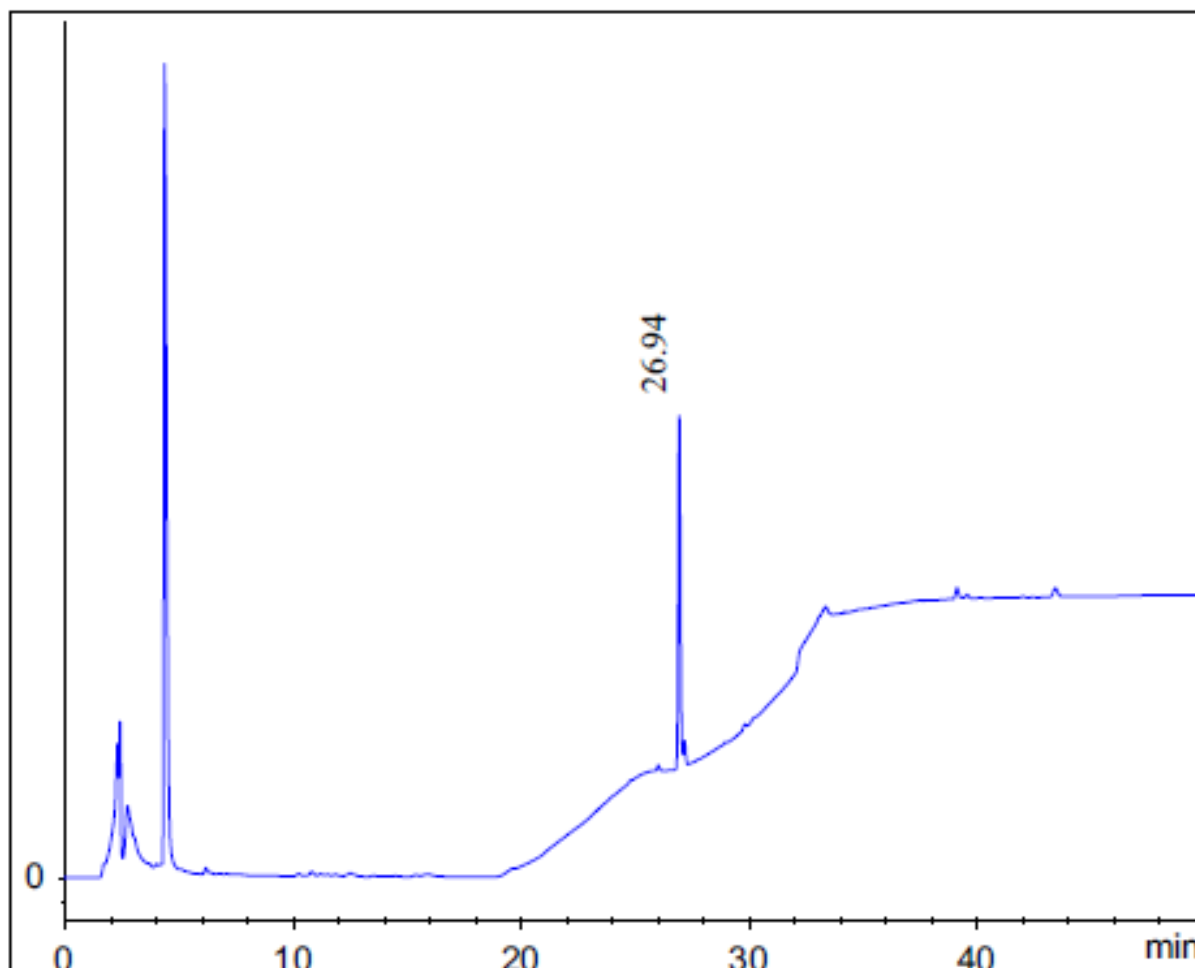


Figure 29: Vérification de la pureté de l'AceDoPC synthétisée par HPLC.

I.1.1.2 Confirmation de la structure de l'AceDoPC

Spectrométrie de masse MS/MS :

La structure de l'AceDoPC formée a été confirmée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Un spectre de fragmentation caractéristique obtenu en mode positive ESI-QqQ (Electrospray Ionization-Triple Quadripôle) est représenté ici. L'ion moléculaire $[MH]^+$ de l'AceDoPC est m/z 610. La fragmentation de l'ion précurseur par CID (Collision Induced Dissociation) produit les ions fils à m/z 551, m/z 427, m/z 184 (correspondant aux fragmentations annotées sur la figure 30). Le spectre de masse obtenu confirme bien la structure de l'AceDoPC.

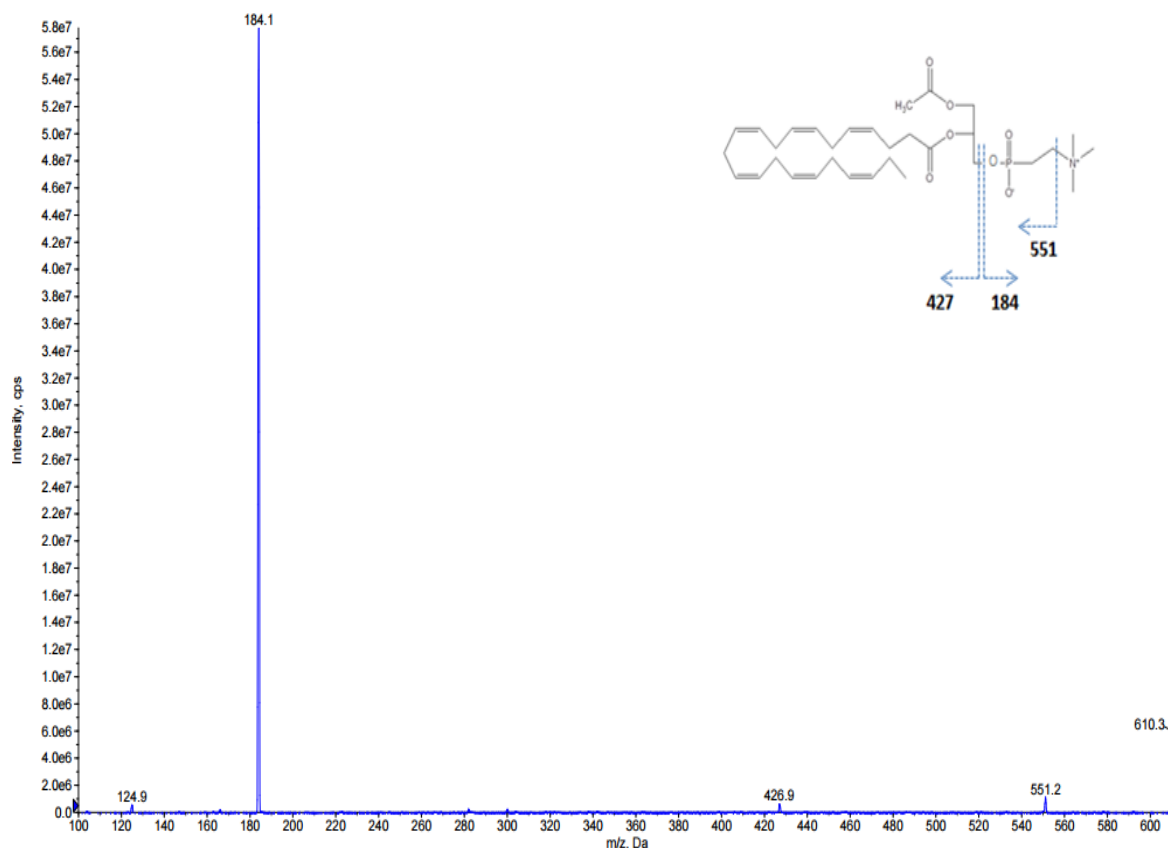


Figure 30: Analyse par MS/MS de la structure de l'AceDoPC.

Résonance magnétique nucléaire (RMN) :

La structure de la molécule d'AceDoPC a été ensuite analysée par RMN. Les RMN du proton (1H) et du carbone 13 (^{13}C) ont été réalisées et pour savoir si l'on avait un seul ou deux produits phosphorés dus éventuellement à la formation au cours de la synthèse d'un isomère de position de l'AceDoPC, nous avons aussi analysé le produit en RMN du Phosphore 31. Nous avons observé un seul pic ce qui prouvait que l'on avait un seul type d'atome de phosphore dans notre échantillon. Les trois spectres 1H , ^{13}C et ^{31}P ont montré qu'on avait bien la molécule d'AceDoPC mais sachant que les spectres RMN du proton des deux isomères de l'AceDoPC sont identiques d'après Polette et al., 1999 et que nous avons formé *a priori* un seul isomère phosphoré, la question était de savoir si l'on avait bien synthétisé l'isomère 1-acétyl,2-DHA-GPC ?

Pour répondre à cette question, des expériences de RMN à deux dimensions (2D) ont permis de voir à quel carbone du glycérol était attaché le groupement acétyle et de déduire que l'on n'avait pas formation de l'autre isomère 1-DHA,2-acétyl-GPC.

I.1.1.3 Modélisation moléculaire de l'AceDoPC et de la lysoPC-DHA

La modélisation moléculaire de l'AceDoPC et de la lysoPC-DHA a été réalisée en utilisant le logiciel de SYBYL (TRIPOS Inc., St Louis, MO). Ces molécules ont été construites et l'énergie a été réduite au minimum. Les potentiels hydrophobes et électrostatiques sur les surfaces moléculaires ont été calculés avec l'option MOLCAD (MOlecular Computer Aided Design) du logiciel SYBYL.

I.1.2 Synthèse de 1-palmitoyl,2-[^{14}C]docosaénoyl-glycérophosphocholine ou [^{14}C]-PC-DHA

La PC contenant du DHA (figure 31) marqué en position *sn*-2 n'étant pas commercialisées, il a été nécessaire de la synthétiser.

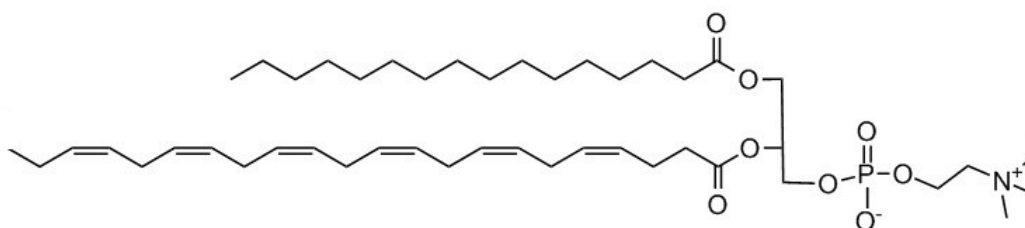


Figure 31: Structure de la 1-palmitoyl,2-[^{14}C]-docosaénoyl-glycérophosphocholine (PC-DHA).

La [^{14}C]-PC-DHA est obtenue par acylation de 1-palmitoyl,2-lysoPC commerciale par le [^{14}C]-DHA dans des conditions similaires à celles de la synthèse de l'AceDoPC marquée. L'acylation de la lysoPC a lieu sous agitation, à température ambiante, à l'abri de la lumière, en milieu anhydre et en présence du BHT, de DCC, de DMAP et de DMF. 6 μmoles de lysoPC sont lyophilisées puis dissous dans 20 μl de DMF et 200 μl de chloroforme distillé. Le DCC et la DMAP en solution dans du chloroforme sont ajoutés au mélange. Du [^{14}C]-DHA (58,8 mCi/mmol ; 25 μCi) et du DHA non marqué (6 μmoles) sont dissous dans 200 μl de chloroforme anhydre. Le mélange DHA + [^{14}C]-DHA est ajouté au tube contenant la lysoPC. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 48 heures. Après filtration, la [^{14}C]-PC-DHA est purifiée par extraction en phase solide (SPE) utilisant une colonne de silice silanol Chromabond (Machery-Nagel). Sa pureté est vérifiée au lecteur de plaques radioactives (figure 32) et la radioactivité de la PC-DHA est déterminée par scintillation liquide. Le rendement de la réaction d'acylation est de 30%.

Comme pour l'AceDoPC, la [^{14}C]-PC-DHA synthétisée sera utilisée pour réaliser l'étude *in vitro* de passage du DHA à travers un modèle de BHE ainsi que l'étude *in vivo*, chez le rat, de captation cérébrale du DHA estérifié ou non.

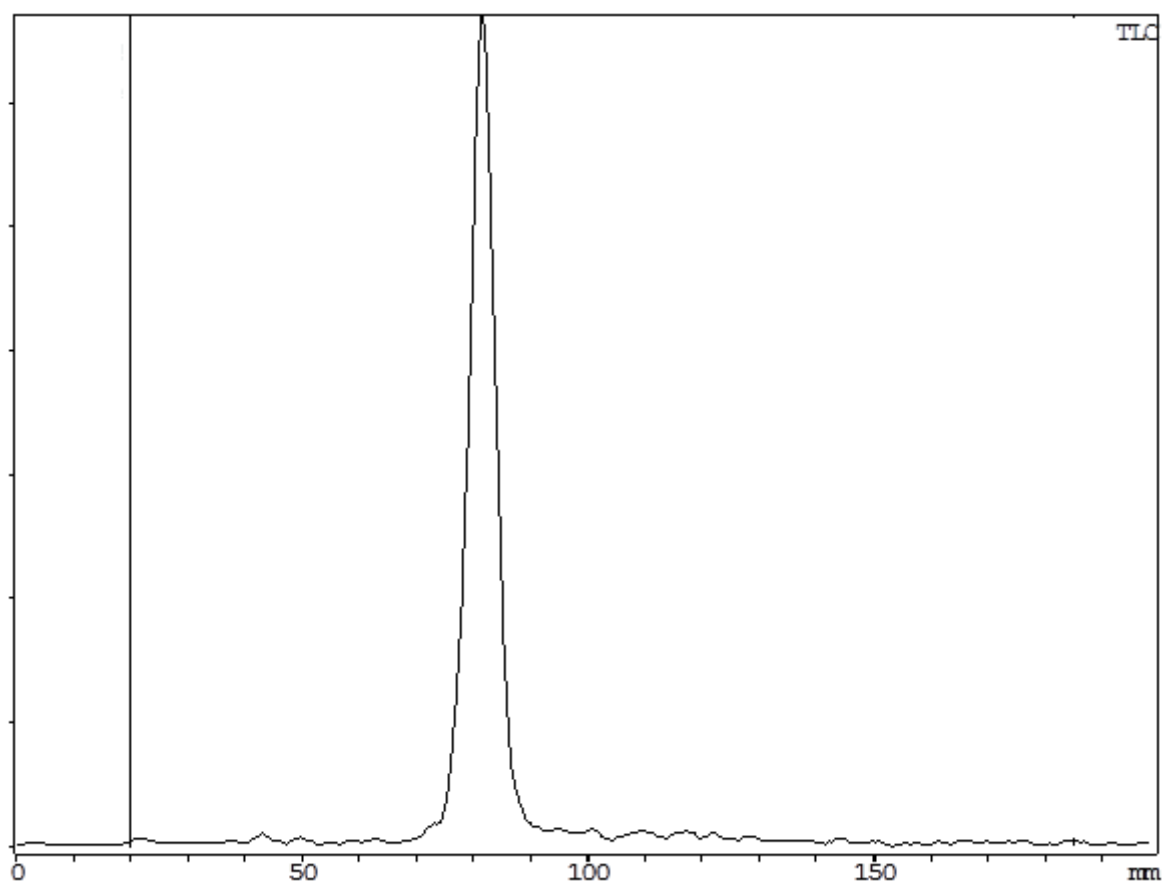


Figure 32: *Détermination par radiochromatographie en couche mince de la pureté radioactive de la $[^{14}\text{C}]$ -PC-DHA.*

I.2 Etude de passage du DHA, de la PC-DHA et de l'AceDoPC à travers un modèle de barrière hémato-encéphalique reconstituée *in vitro*

I.2.1 Modèle *in vitro* de BHE

Le but de cette étude est d'évaluer le passage des composés (AceDoPC vs PC-DHA vs DHA) à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) en utilisant un modèle *in vitro* (Cecchelli et al., 1999). Le modèle décrit consiste en une coculture des cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins (CECCB) et des cellules gliales mimant étroitement la BHE *in vivo* (Lundquist et al., 2002). Ce modèle est développé au laboratoire de physiopathologie de barrière hémato-encéphalique (LBHE), Lens, France. Les méthodes permettant l'obtention de ces cultures ne seront pas toutes décrites en détail mais seulement résumées.

I.2.1.1 Cultures des cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins (CECCB)

Les CECCB ont été isolées selon la méthode décrite par Meresse et al. (1989). Des colonies de cellules endothéliales primaires de capillaires cérébraux sont clonées après microtrypsination. Le milieu utilisé pour la culture des cellules est du DMEM ('Dulbecco's Modified Eagle's Medium') contenant 10% de sérum de cheval, 10% de sérum de veau fœtal, 2mM de glutamine et 50µg/ml de gentamycine. Le facteur de croissance bFGF (basic fibroblast growth factor, 1 ng/ml) est ajouté tous les deux jours. Les cellules sont stockées dans l'azote liquide au 3^{ème} passage. Pour réaliser les expériences, les cellules sont décongelées et utilisées entre les passages 4 et 7.

I.2.1.2 Culture des cellules gliales

Les cultures primaires de cellules gliales sont isolées à partir du cortex cérébral de rats nouveau-nés (Booher et Sensenbrenner, 1972). Après avoir ôté les méninges, le tissu cérébral est forcé doucement au travers d'un tamis en nylon. Les cellules gliales sont étalées dans des plaques de 6 puits à une concentration de $1,25 \times 10^5$ cells/ml de milieu DMEM supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal, 2mM de glutamine, et 50µg/ml de gentamycine. Le milieu est changé deux fois par semaine. Après trois semaines, les cultures gliales sont stabilisées et composées d'astrocytes (~ 60%), d'oligodendrocytes et de cellules microgliales. Les cellules gliales sont caractérisées par la présence de la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein).

I.2.1.3 Préparation des filtres

Les filtres pour culture cellulaire (Transwell ; membrane de polycarbonate ; pores, 0,4µm ; diamètre, 24 mm, COSTAR, 3412) sont couverts sur la face supérieure avec du collagène extrait de queue de rat selon la méthode de Bornstein (1958).

I.2.1.4 Coculture de cellules endothéliales des capillaires cérébraux et de cellules gliales

Les CECCB (utilisées entre les passages 4 et 7) sont trypsinées et déposées sur la face supérieure d'un filtre recouvert de collagène de queue de rat, à une concentration de 4×10^5 cellules/ml de milieu.

Les CECCB sont mises en présence d'une culture de cellules glialesensemencées dans le compartiment inférieur du puit (figure 33). Le milieu utilisé pour la co-culture est du DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, 2mM de glutamine, 50µg/ml de gentamycine et 1ng/ml de bFGF (changé tous les deux jours). Dans ces conditions, les cellules endothéliales forment une monocouche confluyente en 7 jours.

La barrière possède ses propriétés définitives après 12 jours de co-culture.

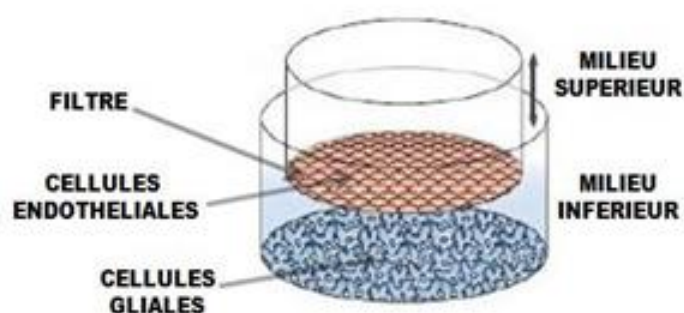


Figure 33: *Modèle de co-culture de cellules endothéliales des capillaires cérébraux et de cellules gliales.*

L'une des principales caractéristiques de la BHE est la présence des jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales limitant ainsi la perméabilité des solutés à travers la BHE.

Des études d'immunofluorescence (figure 34) ont montré que les CECCB, dans ces conditions, expriment de nombreuses protéines associées aux jonctions serrées : actine, ZO-1, ZO-2, pp120, caténine, F actine et occludine. La mesure de la résistance électrique montre que les cellules possèdent une résistance élevée ($500\text{-}800 \text{ ohms/cm}^2$) et une faible perméabilité (Dehouck et al., 1990), ce qui indique que ce modèle de BHE est largement approprié pour l'étude de transport de molécules.

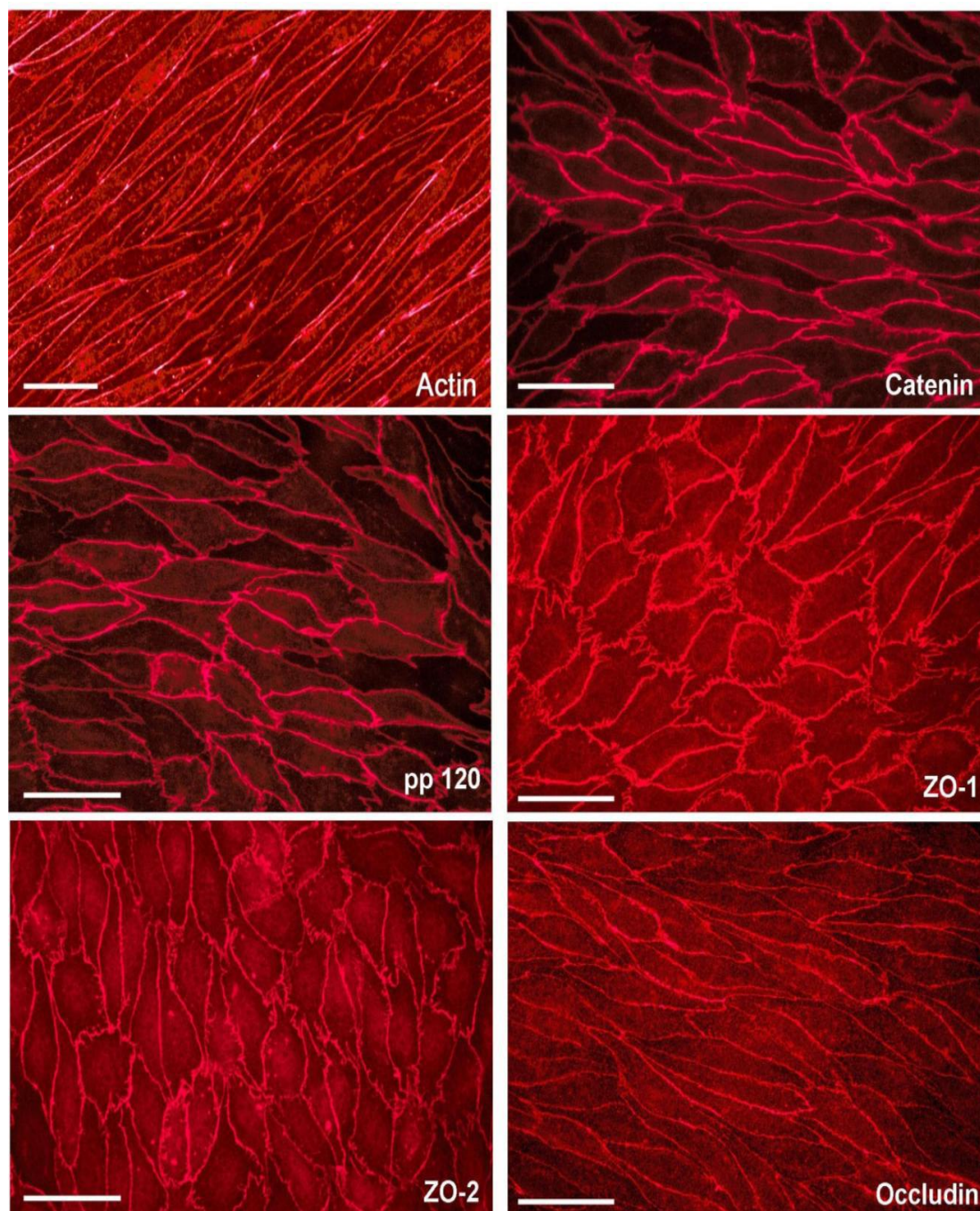


Figure 34: *Immunofluorescence des cellules endothéliales des capillaires cérébraux et caractérisation des jonctions serrées.*

(Bars= 30 μ m)

I.2.2 Incubation des cellules avec les substrats marqués : l'AceDoPC, la PC-DHA et le DHA non estérifié

Les molécules marquées, [^{14}C]-AceDoPC, [^{14}C]-PC-DHA et [^{14}C]-DHA, ont été préalablement incubées chacune dans du plasma de rat pendant 1 h30 à 37°C.

La concentration finale en AceDoPC, PC-DHA ou DHA non estérifié marqué ajouté dans le milieu de culture est de 5 μM .

Quatre heures avant l'incubation des substrats marqués, les cellules ont été rincées puis incubées à 37°C avec du DMEM seul pour éliminer les traces de sérum et éviter ainsi une compétition entre les acides gras du sérum et les lipides radioactifs à incuber (1,5 ml de DMEM ont été ajoutés dans le compartiment supérieur (luminal) et 2,5 ml ont été ajoutés dans le compartiment inférieur (abluminal)).

A la suite des 4h de pré-incubation dans du DMEM dépourvu de sérum, le milieu supérieur a été remplacé par du DMEM contenant les molécules marquées (0,1 μCi de [^{14}C]) et solubilisées dans le plasma.

L'effet des substrats marqués sur l'intégrité de la BHE a été testé en parallèle en incubant les cellules avec du jaune Lucifer, une petite molécule hydrophile ayant une faible pénétration cérébrale.

Les incubations ont été réalisées pendant 4h à 37°C. A la fin des incubations, les milieux ont été prélevés ainsi que les cellules gliales et endothéliales.

Les cellules ont été rincées 2 fois avec 0,5 ml de tampon phosphate PBS. Les cellules ont été récupérées par grattage et le filtre de l'insert a été découpé.

La radioactivité des compartiments supérieur et inférieur ainsi que des cellules endothéliales et gliales a été déterminée sur une prise aliquote de volume précis et quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

I.2.3 Techniques analytiques

I.2.3.1 Extraction des lipides des milieux et des cellules

Les lipides totaux des milieux luminal et abluminal ont été extraits selon la méthode de Bligh et Dyer (1959). Pour un volume de milieu a été ajoutés 3 volumes d'éthanol et 0,09 volumes d'hydroxytoluène butylé (BHT) à 5 μ M. Les tubes ont été fermés sous azote et agités pour 1 min. Après agitation, 6 volumes de chloroforme ont été ajoutés ; les tubes ont été de nouveau agités puis le mélange a été laissé décanter toute la nuit à 4⁰C. La centrifugation des tubes à 450g pendant 5min a permis la visualisation de 2 phases : la phase organique inférieure contenant les lipides et phase aqueuse supérieure. La phase organique a été prélevée et une seconde extraction de la phase aqueuse a été réalisée par ajout de 3 volumes d'éthanol et de 0,09 volumes de BHT. Les phases organiques ont été réunies et ont été évaporées à sec sous azote ; les lipides ont été repris par un volume connu de chloroforme/éthanol (2:1, v/v). Les lipides totaux des cellules endothéliales et des cellules gliales ont été extraits selon la même méthode que les lipides des milieux. Les cellules ont cependant été soniquées pendant 5min après ajout des 3 volumes d'éthanol et des 0,09 volumes de BHT. Après sonication, 6 volumes de chloroforme ont été ajoutés puis le même protocole que celui précédemment décrit pour l'extraction des lipides des milieux a été réalisé. La radioactivité de chaque extrait lipidique et de chaque phase aqueuse a été déterminée sur une prise aliquote et quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide. Les échantillons ont été stockés à -20⁰C jusqu'à l'analyse (séparation des différentes classes lipidiques).

I.2.3.2 Méthode de séparation des classes de lipides et quantification de leur radioactivité

Après évaporation des solvants les lipides des cellules et des milieux ont été solubilisés dans 100 μ l de chloroforme/éthanol (2/1, v/v) et déposés sur une plaque de gel de silice afin de déterminer leur composition.

La séparation des différentes classes de phospholipides a été réalisée en deux temps :

- une première migration a été effectuée en utilisant le mélange de chloroforme/méthanol (80/8, v/v) permettant aux lipides neutres de migrer vers le front du solvant et ainsi d'améliorer la séparation des phospholipides;
- la séparation des différentes classes de phospholipides a été réalisée par une seconde migration avec le système chloroforme/méthanol/méthylamine à 40% dans l'eau (60/20/5, v/v/v).

Différents standards de migration ont été utilisés : AceDoPC, PS, PC, LysoPC, DHA, PE, esters de cholestérol et triglycérides. Après élution, les standards de migration ont été révélés à l'acide phosphomolybdique ce qui permet d'identifier les différentes classes de lipides (figure 35). La lecture de la radioactivité à l'aide de lecteur de plaques radioactives (système de détection Ray test) permet de révéler les pics radioactifs. Par comparaison avec les standards, les bandes de gel de silice ont été grattées, les lipides ont été ainsi extraits de la silice récupérées dans des pots de comptage et après ajout de 10ml de Picofluor et homogénéisation, la radioactivité des différentes classes lipidiques a été quantifiée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Tricarb 460 Packard).

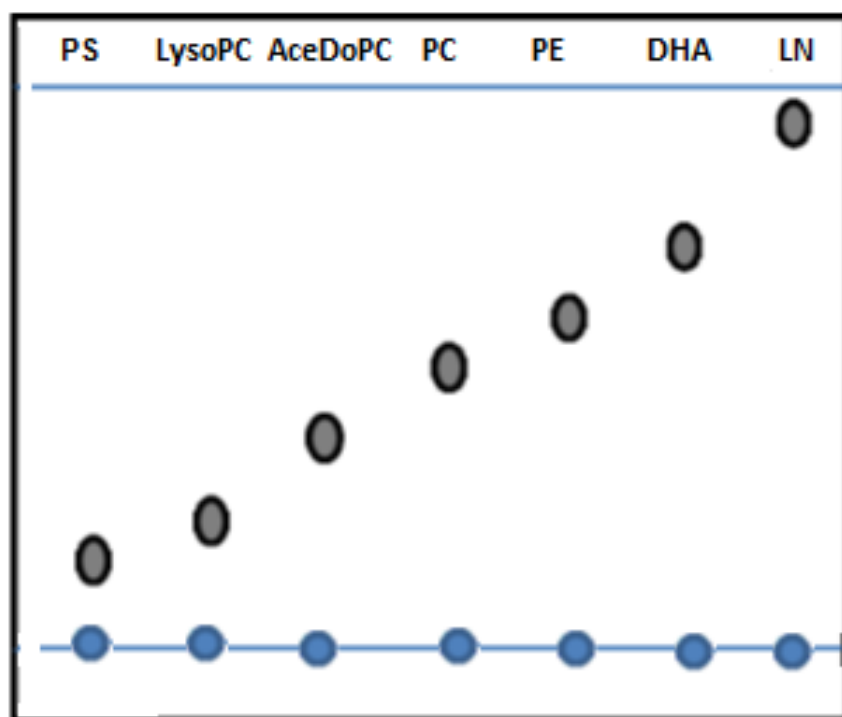


Figure 35: Représentation schématique de la séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) des différentes classes de lipides.

Séparation avec un système chloroforme/méthanol/méthylamine à 40% dans l'eau (60/20/5 ; v/v/v).
 PS : Phosphatidylsérine ; lysoPC: lysophosphatidylcholine ; AceDoPC : 1-acétyl,2-docosahexaénoyl-glycérophosphocholine ; PC: Phosphatidylcholine ; PE : Phosphatidyléthanolamine ; DHA : acide docosahexaénoïque ; LN : lipides neutres.

I.3 Etude *in vivo* de captation cérébrale du DHA

I.3.1 Protocole animal

Des rats mâles Wistar (Janvier Lab, Le Genest St Isle, France) âgés de 20 jours et pesant 150-200 g à leur arrivée au laboratoire, ont été hébergés dans une pièce convenablement aérée, à température contrôlée (24°C), ventilée et soumise à un cycle de 12 heures de lumière suivies de 12 heures d'obscurité.

Les animaux ont été mis en cage à raison de 5 par cage et ont bénéficié d'un accès libre à la nourriture et à l'eau.

Après quelques jours d'acclimatation, les rats ont été utilisés pour étudier la captation cérébrale du DHA apporté sous différentes formes : AceDoPC, PC-DHA ou DHA.

Tous les protocoles expérimentaux ont été accordés par le ministère de l'agriculture français et l'agence vétérinaire départementale du Rhône. Tous les animaux ont été traités au sein de l'animalerie de l'INSA de Lyon en accord avec les réglementations accordés par l'ECC (European Communities Council, 24 novembre 1986, 02/889/ECC).

Les rats ont été anesthésiés avec du pentobarbital avant injection des molécules marquées au carbone 14.

100 nmoles de [^{14}C]-DHA (0,5 μCi) ou [^{14}C]-AceDoPC (0,5 μCi), incubés préalablement dans du plasma de rat, ont été injectées dans la veine de la queue de rat (1mM injecté). Les rats (n=3 par groupe) ont été sacrifiés 15min, 1h, 6h, 24h et 48h post-injection. Lors du sacrifice, le sang du rat a été prélevé par piqûre au cœur et placé dans un tube hépariné EDTA (1 mg/ml) afin d'éviter la coagulation. La circulation sanguine a été lavée par 10ml d'une solution froide (4°C) de NaCl 0,9%. Les organes (cerveau, cœur, yeux, foie) ont été ensuite rapidement prélevés, pesés et congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

Le sang a été centrifugé à 2600g pendant 10min afin d'en récupérer le plasma qui sera également congelé à -80°C.

Afin de comparer la captation cérébrale du DHA estérifié dans PC-DHA forme naturelle retrouvée dans les aliments, des injections intraveineuses du [^{14}C]-PC-DHA (0,5 μCi) ont été réalisées selon les mêmes conditions citées précédemment. Les rats (n=4 par groupe) ont été sacrifiés 1 h et 48 h post-injection. Les organes ainsi que le sang ont été prélevés.

I.3.2 Techniques analytiques

I.3.2.1 Extraction des lipides totaux à partir des tissus et du plasma de rat.

Les tissus des rats (cerveau, yeux, cœur, foie) ont été préalablement découpés en petits morceaux, puis broyés à l'aide d'un polytron ultra-turrax T8 (IKA Labortechnik Staufen, Allemagne) pendant 2 à 3min dans 1 volume d'éthanol (par g de tissu) ; 2 volumes de chloroforme et 0,03 volumes de BHT (antioxydants) ont été ensuite ajoutés.

Les yeux ont été broyés dans un premier temps à l'aide d'un broyeur de tissus type Potter-Elvehjem verre-verre puis à l'aide du polytron.

Le tout a été à nouveau broyé puis centrifugé 10min à 2000t/min. La phase organique contenant les lipides a été récupérée. Le broyat tissulaire a été réextrait par 1 volume d'éthanol et 2 volumes de chloroforme par g de tissu et re-centrifugé. Les 2 extraits ont été combinés.

Afin de quantifier la radioactivité liée à la totalité des lipides extraits, les solvants ont été évaporés totalement. Les lipides ont ensuite été dissous dans un volume déterminé de chloroforme/éthanol (2/1, v/v) et des prises d'aliquotes sur 1/10 du volume ont été réalisées pour compter la radioactivité.

Les lipides totaux du plasma ont été extraits selon la même méthode que celle décrite pour les lipides des milieux du modèle *in vitro* de la BHE (I.2.3.1. Extraction des lipides des milieux et des cellules).

I.3.2.2 Séparation des classes lipidiques par CCM et quantification de leur radioactivité

La séparation des classes lipidiques extraites des différents organes et du plasma a été faite selon les mêmes étapes que celles décrites dans la partie 1.2.3.2 (Méthode de séparation des classes de lipides et quantification de leur radioactivité).

I.3.2.3 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Afin de savoir à quel transporteur plasmatique le DHA estérifié sous forme d'AceDoPC est lié, les lipoprotéines et l'albumine plasmatique des rats sacrifiés 1h après injection d' $[^{14}\text{C}]$ -AceDoPC ou de $[^{14}\text{C}]$ -PC-DHA (0,5 μCi , 1mM) ont été séparées par FPLC. La séparation des lipoprotéines et de l'albumine par FPLC est basée sur leur différence de taille (Zambon et al., 1996). Il s'agit d'une chromatographie de gel exclusion (ou gel filtration) qui permet leur séparation par ordre de taille décroissante.

Le plasma de rat a été filtré à l'aide de filtres Millipore® (0,22 μm) pour éliminer les débris cellulaires et les chylomicrons puis injecté sur une colonne Superose 6HR montée sur une chaîne de FPLC. Un tampon Tris pH 7,4 (Tableau 4) circulant à un débit de 0,3ml/min pour une pression de 150 psi permet l'élution des lipoprotéines. L'élution des échantillons a été suivie par détection de la densité optique (DO) à 280 nm. Des fractions de 0,3ml ont alors été collectées.

Pour repérer les différentes classes de lipoprotéines plasmatiques (Very Low-Density Lipoprotein VLDL, Low-Density Lipoprotein LDL, High-Density Lipoprotein HDL), le cholestérol et les triglycérides ont été dosés dans chaque fraction (dosage enzymatique et colorimétrique : Kits Biomérieux). L'albumine a été également dosée dans chacune des fractions.

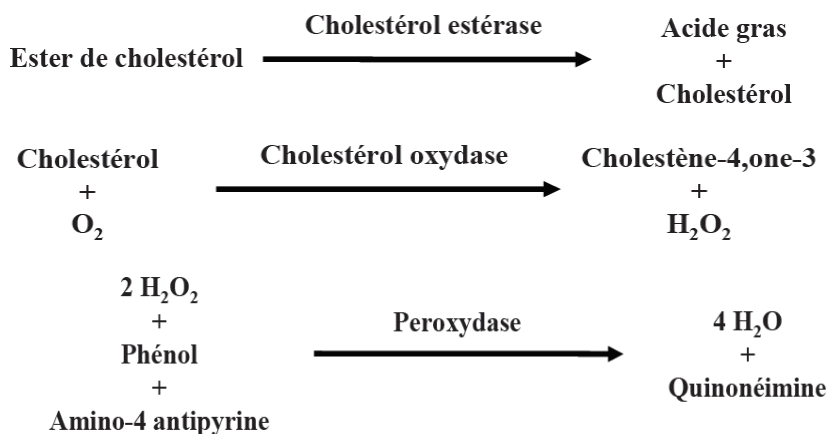
Une fois les différentes fractions de lipoprotéines et d'albumine identifiées, les fractions correspondantes à chacune des classes ont été poolées et la radioactivité correspondante a été mesurée dans chaque pool de fractions par comptage de la radioactivité.

Tris-HCl (10 mM)	2.42 g
NaCl (150 mM)	17.53 g
EDTA (2 mM)	1.49 g
Azide de sodium (0.02%)	0.4 g
Qsp 2l d'eau distillée	
pH 7,4	

Tableau 4: Composition du tampon Tris-HCl pH 7,4.

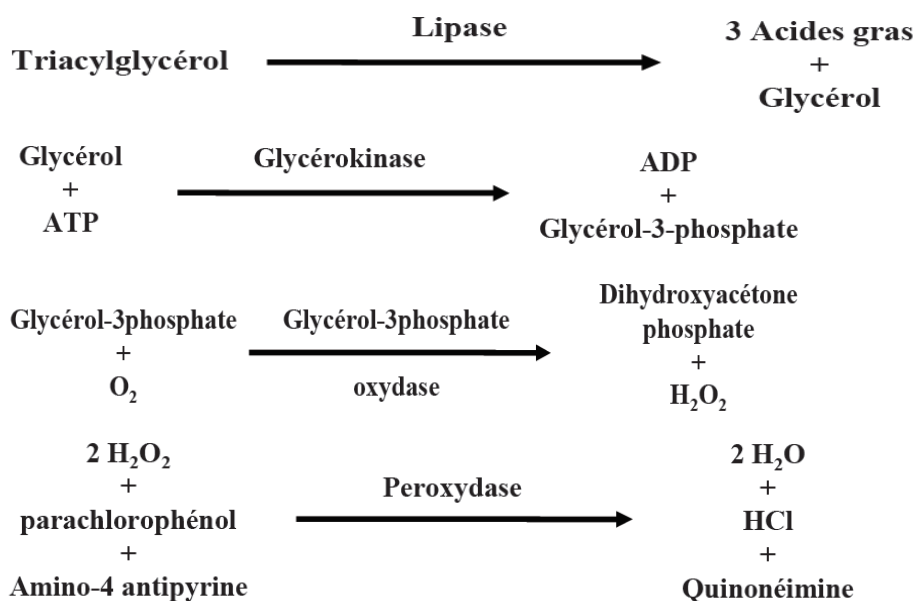
Dosage du cholestérol

Le contenu en cholestérol des différentes fractions récupérées par FPLC a été déterminé par une réaction enzymatique selon la méthode d'Allain (Allain et al., 1974). Celle-ci consiste à hydrolyser les esters de cholestérol à l'aide de cholestérol estérase pour former du cholestérol et des acides gras non estérifiés. Le cholestérol, en présence de dioxygène, est oxydé par la cholestérol oxydase en cholestène-4,one-3 et peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxydase, le peroxyde d'hydrogène se combine au phénol et à l' amino-4 antipyrine pour former de la quinonéimine, absorbant en UV-visible de 492 à 550 nm.



Dosage des triglycérides

Le contenu en TG des différentes fractions récupérées par FPLC a été déterminé par une réaction enzymatique selon la méthode de Fossati (Fossati et Prencipe, 1982). Celle-ci consiste à hydrolyser les triglycérides en glycérol et acides gras non estérifiés à l'aide d'une lipase. Le glycérol, en présence d'ATP, est phosphorylé par une glycérokinase pour donner du glycérol-3-phosphate. Ce dernier est oxydé en dihydroxyacétone phosphate et en peroxyde d'hydrogène par la glycérol-3-phosphate oxydase. En présence de peroxydase, le peroxyde d'hydrogène se combine au 4-aminoantipyrine et au 3,5 dichloro-2-hydroxybenzène sulfonate pour former de la quinonéimine, absorbant de 492 à 550 nm.



Dosage de l'albumine :

Parallèlement, l'albumine a été dosée à l'aide du vert de bromocrésol qui se fixe à cette protéine en milieu tamponné à pH 4,2. Les deux molécules forment un complexe coloré dont l'absorbance mesurée à 630 nm est proportionnelle à la concentration en albumine.

I.3.3 Autoradiographie cérébrale chez le rat :

L'autoradiographie est une technique se basant sur l'utilisation d'une molécule couplée à un isotope radioactif (un radiotraceur), qui va se fixer à la structure moléculaire d'intérêt.

Dans nos études, nous nous sommes intéressés à la détection qualitative de la répartition anatomique du [¹⁴C]-DHA dans le cerveau de rats.

L' [¹⁴C]-AceDoPC a été injectée dans la veine de la queue de rat dans les mêmes conditions que celles décrites dans la partie matériels et méthodes, 1.3.1. Le rat a été sacrifié 48h après injection. Le cerveau a été prélevé puis immergé dans une solution d'isopentane (2-méthylbutane) refroidie à -30°C dans de l'azote liquide.

Des coupes coronales de 40µm de diamètre ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Microm Microtech, France) à -20°C puis placées sur une lamelle de verres (Superfrost plus Slides, Fischer Scientific). Les lames ont été apposées contre un film autoradiographique (sensitive phosphor screen, BAS-TR2025 Fuji Medical Systems inc., Stamford, CT) pendant 3 jours dans une cassette en présence de standards marqués au ¹⁴C. Le film est composé d'une fine couche de cristaux photostimulables déposée sur un support en polyester. L'ensemble est recouvert d'une fine protection en plastique.

Le film a été ensuite enlevé et analysé immédiatement au phosphor imageur (Storm 820, Amersham, Molecular Dynamics, St Louis, USA).

Les différentes régions cérébrales ont été identifiées en se référant à l'atlas stéréotaxique du cerveau de rat (Paxinos et Watson, 1998).

I.4 Analyse statistique :

Les données représentent la moyenne \pm SD de trois valeurs pour l'étude *in vivo* et \pm SEM de quatre valeurs pour l'étude *in vitro*. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Prism (GraphPad, La Jolla). Une analyse de variance suivie d'un test de Bonferroni ont été utilisés pour comparer les échantillons. Le seuil de significativité choisi a été de 5% ($P < 0,05$).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre 1: Transfert du DHA non estérifié ou estérifié (AceDoPC, PC-DHA) à travers la BHE reconstituée *in vitro*

Afin de vérifier l'hypothèse que l'AceDoPC serait un transporteur efficace de DHA au cerveau, comme l'est la lysoPC, nous avons dans un premier temps comparé le passage du DHA sous forme non estérifiée ou estérifiée en position *sn*-2 de l'AceDoPC ou d'une PC à travers un modèle *in vitro* de BHE, mimant la BHE *in vivo* (figure 36). Ce modèle consiste, comme décrit plus précisément dans le chapitre « Matériels et méthodes », en une co-culture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes.

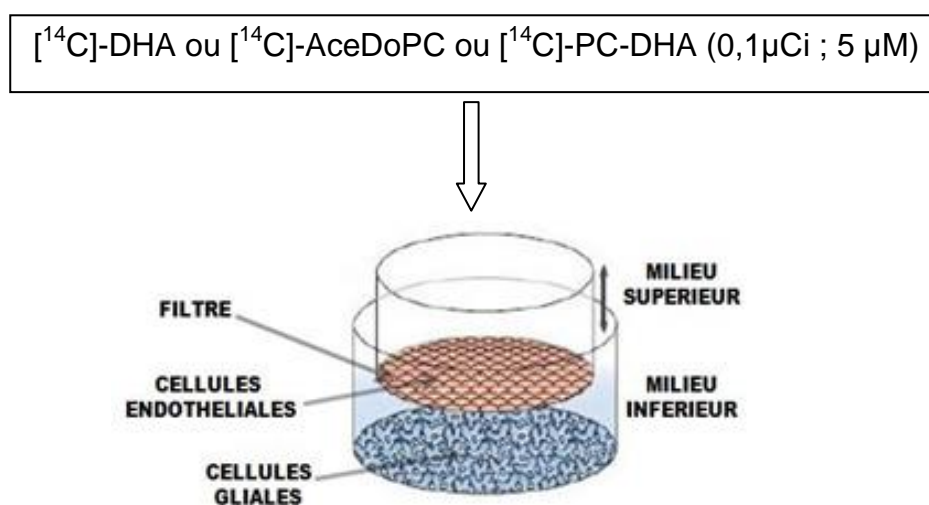


Figure 36: Incubation des substrats marqués dans le modèle de BHE *in vitro*.

Le modèle *in vitro* de BHE consiste en une co-culture de deux types cellulaires : les cellules endothéliales de capillaires cérébraux, cultivées à confluence sur un insert, lequel est placé sur le milieu d'une culture de cellules gliales. Les milieux de culture supérieur et inférieur sont du DMEM supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau et 10% (v/v) de sérum de cheval.

Avant incubation avec les substrats marqués, les milieux ont été remplacés par du DMEM seul sans sérum pendant 4 heures à 37°C (période de pré-incubation). A l'issue de la période de pré-incubation, le milieu luminal (supérieur) a été remplacé par du DMEM contenant du $[^{14}\text{C}]$ -DHA non estérifié, de la $[^{14}\text{C}]$ -PC-DHA ou de l' $[^{14}\text{C}]$ -AceDoPC (0,1µCi, 5µM) préalablement liés au plasma 1% (v/v) 1h 30 à 37°C.

Les incubations avec les substrats marqués ont été réalisées à 37°C pendant 4 heures.

Concernant certains paramètres du protocole expérimental:

- Nous avons supprimé le sérum des milieux de culture supérieur afin d'éviter une compétition avec les acides gras du sérum et les molécules lipidiques marquées ajoutées.
- Nous avons supprimé le sérum du milieu inférieur afin de mimer le milieu interstitiel entre les cellules endothéliales et les cellules gliales, milieu très vraisemblablement dépourvu de lipoprotéines sériques en quantité notable.
- Nous avons pré-incubé les cellules dans du DMEM seul pendant 4 heures afin de permettre aux cellules de s'habituer à leur nouvelles conditions de milieu. Cette période assure la stabilisation cellulaire sans affecter l'intégrité de la BHE (qui sera vérifiée par la suite : test d'intégrité de la BHE en présence du jaune Lucifer).

Nous avons vérifié que l'incubation des solutions plasmatiques d'AceDoPC et de PC-DHA, dans du milieu DMEM à 37°C pendant 4 heures et en absence de cellules, ne dégradait pas les molécules. Ceci a été vérifié par CCM d'une prise aliquote et analyse de la radioactivité à l'aide d'un radioanalyseur. Les figures 37 et 38 montrent qu'aucune dégradation des molécules ne se produit au cours de cette incubation puisqu'on n'a qu'un seul pic au bon temps de rétention.

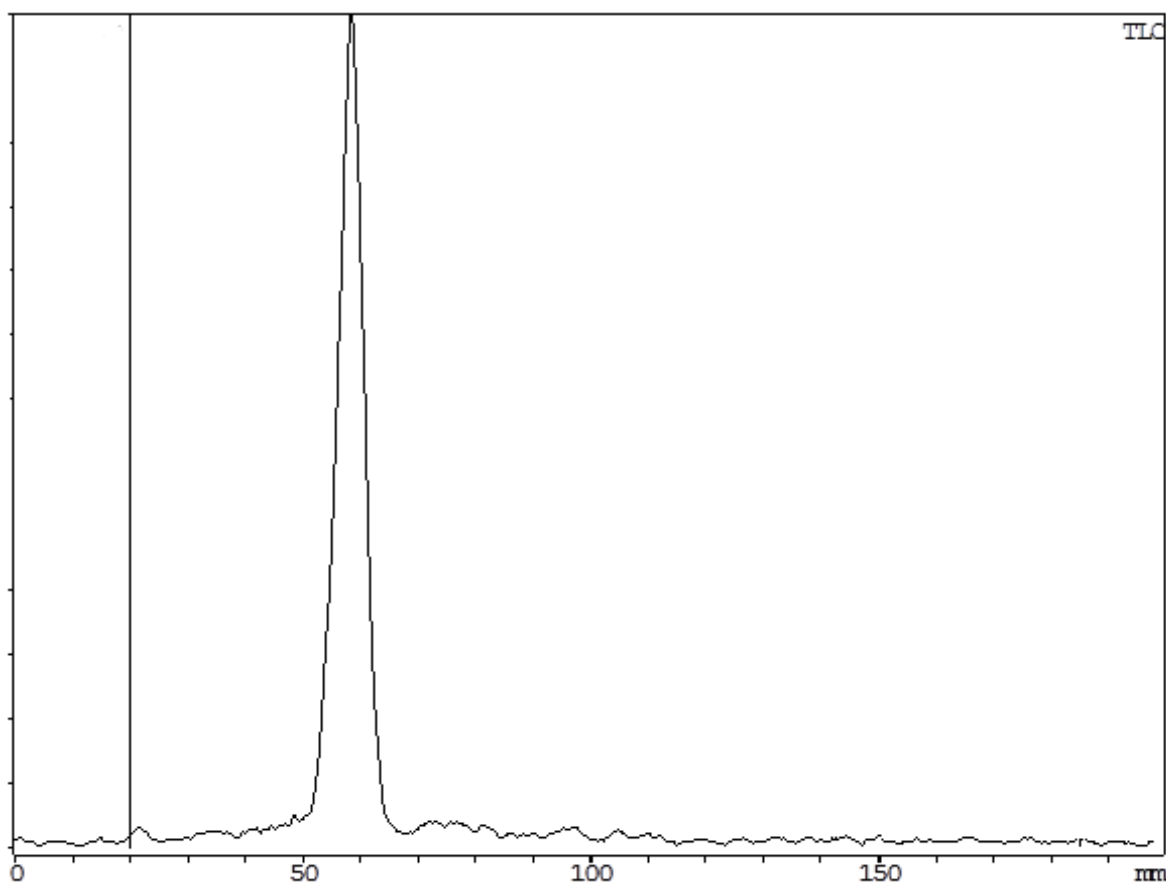


Figure 37: Vérification de l'impact de l'incubation de l' $[^{14}\text{C}]$ -AceDoPC, préalablement incubée avec du plasma, dans du DMEM à 37°C pendant 4 heures par radiochromatographie en couche mince.

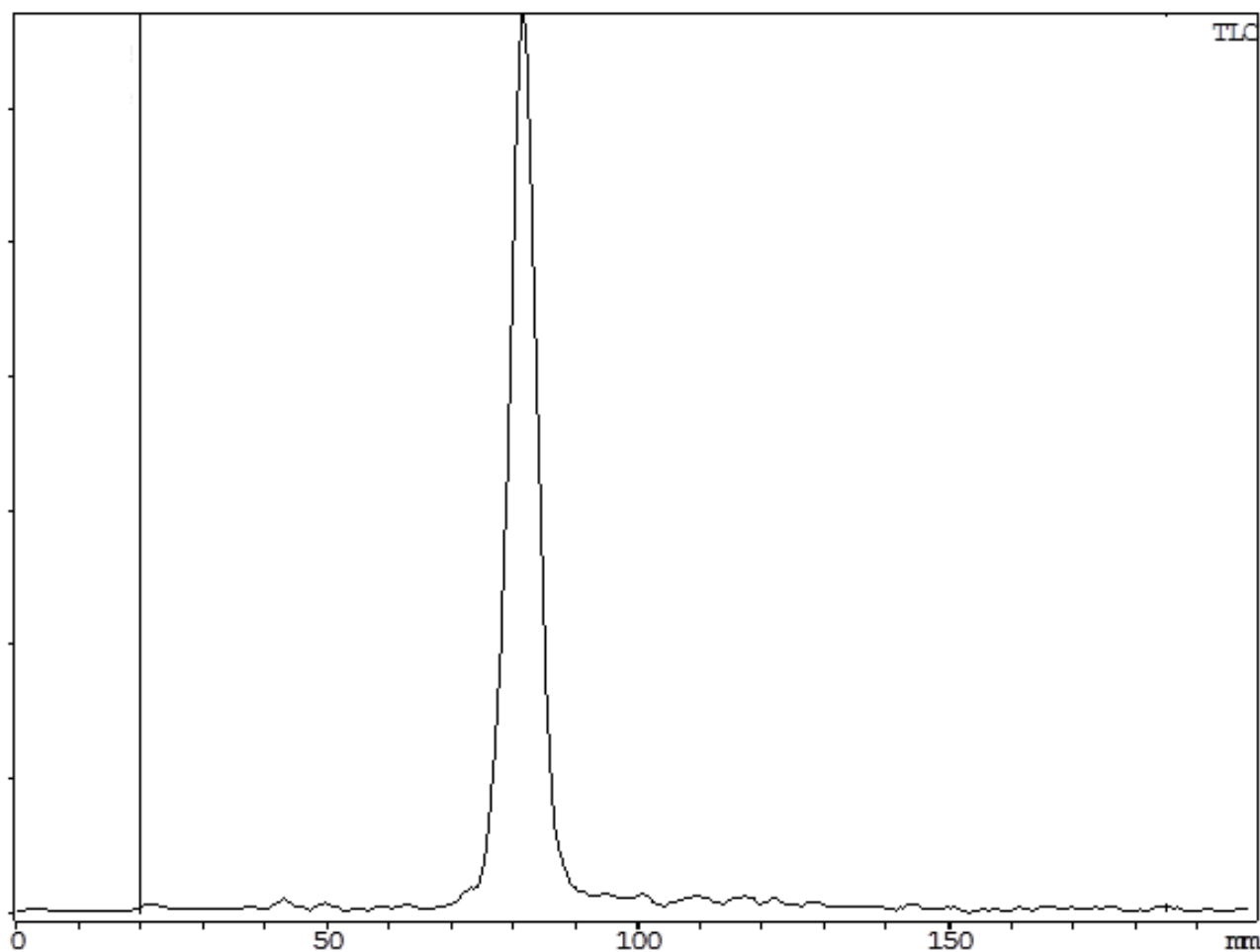


Figure 38: Vérification de l'impact de l'incubation de la $[^{14}\text{C}]$ -PC-DHA préalablement incubée avec du plasma dans du DMEM à 37°C pendant 4 heures par radiochromatographie en couche mince.

I.1 Etude de l'effet des lipides marqués sur l'intégrité de la BHE

Avant d'étudier le passage du DHA non estérifié ou estérifié dans une PC ou AceDoPC à travers la BHE, nous avons tout d'abord contrôlé l'effet de ces molécules sur l'intégrité du modèle de BHE utilisé afin de vérifier que la concentration utilisée ne perturbe pas la BHE. Pour cela, le coefficient de perméabilité de la monocouche endothéliale a été déterminé par un marqueur d'intégrité, le jaune Lucifer, une petite molécule hydrophile ayant une faible pénétration cérébrale. Les molécules lipidiques ont été ajoutées dans le milieu supérieur du modèle de BHE avec le jaune Lucifer. La détermination du coefficient de perméabilité, le «Pe», a été fait selon la technique décrite dans le chapitre « Matériels et méthodes ».

Le tableau 5 résume les coefficients de perméabilité endothéliale du jaune Lucifer ajouté dans le milieu de culture seul, avec du plasma, du DHA, de la PC-DHA ou de l'AceDoPC.

	Pe (cm.min ⁻¹) x 10 ⁻³
Jaune Lucifer seul	0,79
Jaune Lucifer + Plasma 1% (v/v)	0,62
Jaune Lucifer + DHA	0,5
Jaune Lucifer + PC-DHA	0,64
Jaune Lucifer + AceDoPC	0,52

Tableau 5: Coefficient de la perméabilité endothéliale du jaune Lucifer avec ou sans plasma, DHA, PC-DHA ou AceDoPC.

Les solutions de DHA, PC-DHA et AceDoPC marqués (5 µM) sont préparées dans du DMEM contenant 1% (v/v) de plasma et co-incubées avec du jaune Lucifer. Le jaune Lucifer est utilisé comme marqueur paracellulaire permettant d'évaluer l'effet de l'ajout des 3 formes de DHA sur l'intégrité de la BHE. Cette petite molécule hydrophile présente un faible taux de pénétration cérébrale et son faible coefficient de perméabilité endothéliale révèle l'intégrité de la monocouche de cellules endothéliales. L'étude de transport avec le jaune Lucifer est effectuée en triplicat sur des filters revêtus de collagène (Transwell Polycarbonate 0,4µm). L'intégrité de la monocouche est vérifiée avant l'expérimentation avec un contrôle utilisant le jaune Lucifer (Pe = 0,79 x 10⁻³ cm.min⁻¹). Un second contrôle avec du DMEM contenant 1% (v/v) de plasma en présence de jaune Lucifer est réalisé (Pe = 0,62 x 10⁻³ cm.min⁻¹).

Nos résultats montrent que les 3 formes de DHA utilisées (DHA, PC-DHA et AceDoPC) ne sont pas toxiques pour l'intégrité de la BHE (Pe du jaune Lucifer inférieure à 1 x 10⁻³ cm.min⁻¹).

I.2 Distribution de la radioactivité des lipides totaux entre les différents compartiments de la coculture

Les cellules ont été incubées avec 5 μ M de [14 C]-DHA, [14 C]-PC-DHA ou [14 C]-AceDoPC pendant 4 heures (0,1 μ Ci/puits). Nous avons dans un premier temps analysé la distribution de la radioactivité dans les différents compartiments de la co-culture c'est-à-dire les milieux, les cellules endothéliales et les cellules gliales. Les pourcentages de radioactivité sont calculés par rapport à la radioactivité initiale relative à chacun des produits incubés [14 C]-DHA, [14 C]-PC-DHA ou [14 C]-AceDoPC.

I.2.1 Radioactivité des lipides totaux retrouvée dans les milieux supérieur et inférieur

Les résultats des pourcentages de radioactivité retrouvés dans le milieu supérieur et le milieu inférieur du modèle de co-culture après incubation des cellules avec du [14 C]-DHA, [14 C]-PC-DHA ou du [14 C]-AceDoPC sont résumés dans la figure 39.

Le pourcentage de radioactivité initiale retrouvé dans le milieu supérieur après incubation avec du [14 C]-DHA est de 44,9 \pm 0,2 % ; celui obtenu après incubation avec de la [14 C]-PC-DHA est de 83,9 \pm 1,8 % et celui relatif à l' [14 C]-AceDoPC est de 56 \pm 1,3% (figure 39.a).

Ces résultats suggèrent une différence significative de passage de différentes formes d'apport de DHA à travers le modèle de BHE in vitro.

L'analyse de la radioactivité retrouvée dans le milieu inférieur montre que le pourcentage est plus élevé après incubation de [14 C]-AceDoPC (7,5 \pm 0,5 %) qu'après incubation de [14 C]-DHA (4,5 \pm 0,2 %) ou de [14 C]-PC-DHA (3,9 \pm 0,4 %) (figure 39.b).

Ces résultats montrent un passage préférentiel de l'AceDoPC comparativement à la forme non estérifiée du DHA ou au DHA estérifié dans une PC.

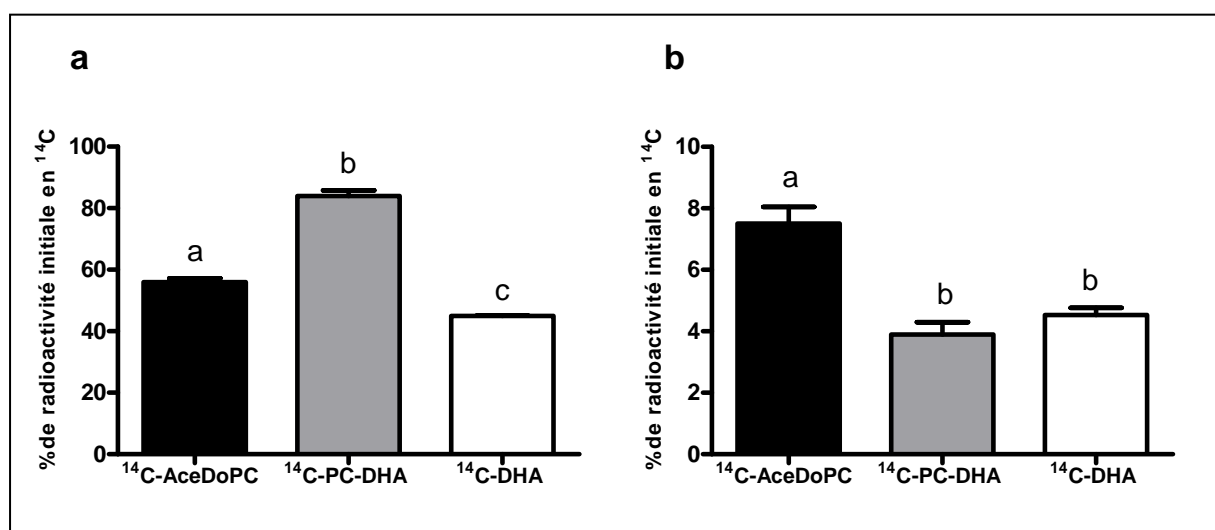


Figure 39: Radioactivité des lipides totaux du milieu supérieur (a) et du milieu inférieur (b).

Avant incubation avec les substrats marqués, les milieux de culture ont été remplacés par du DMEM sans sérum pendant 4 heures à 37°C (période de pré-incubation). A la fin de la période de pré-incubation, le milieu luminal (supérieur) a été remplacé par du DMEM contenant du [¹⁴C]-DHA non estérifié, de la [¹⁴C]-PC-DHA ou de l' [¹⁴C]-AceDoPC (0,1 µCi, 5 µM) préalablement lié au plasma. Les incubations ont été effectuées à 37°C pendant 4 heures. Les milieux ont été prélevés et les cellules ont été rincées puis récupérées par grattage. Les lipides totaux des milieux et des cellules ont été extraits et la radioactivité a été quantifiée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité initiale en ¹⁴C et représentent la moyenne ± SEM de quatre valeurs. Les groupes ont été comparés par une analyse de variance (ANOVA) suivie par un test de Bonferroni. Les données avec différentes lettres sont significativement différentes à P <0,05.

I.2.2 Radioactivité des lipides totaux retrouvée dans les cellules endothéliales et les cellules gliales

La figure 40 représente le pourcentage de radioactivité initiale retrouvé dans les lipides des cellules endothéliales de capillaires cérébraux (figure 40.a) et des cellules gliales (figure 40.b) après incubation avec les différents substrats marqués.

Les résultats montrent que le pourcentage de radioactivité retrouvé dans les lipides totaux des cellules endothéliales est similaire après incubation de DHA non estérifié ou d'AceDoPC (6,1 +/- 1,2 % et 5,1 +/- 0,9 %, respectivement). Un plus faible pourcentage est retrouvé après incubation de PC-DHA (0,9 +/- 0,2 %).

Le pourcentage de radioactivité retrouvé dans les cellules gliales est plus élevé après incubation d' [¹⁴C]-AceDoPC (7,5 +/- 0,7 %) comparativement au [¹⁴C]-DHA (3,7 +/- 1,2 %) et au [¹⁴C]-PC-DHA (0,3 %). Bien que non significativement différent, la proportion de radioactivité retrouvée dans les cellules gliales tend à être plus basse après incubation de PC-DHA comparativement au DHA non estérifié.

Les cellules gliales captent donc plus facilement le DHA estérifié sous forme d'AceDoPC comparativement au DHA non estérifié et au DHA estérifié dans une PC.

La préférence de captation des cellules gliales du DHA estérifié sous forme d'AceDoPC comparativement au DHA non estérifié, n'est pas observée dans les cellules endothéliales.

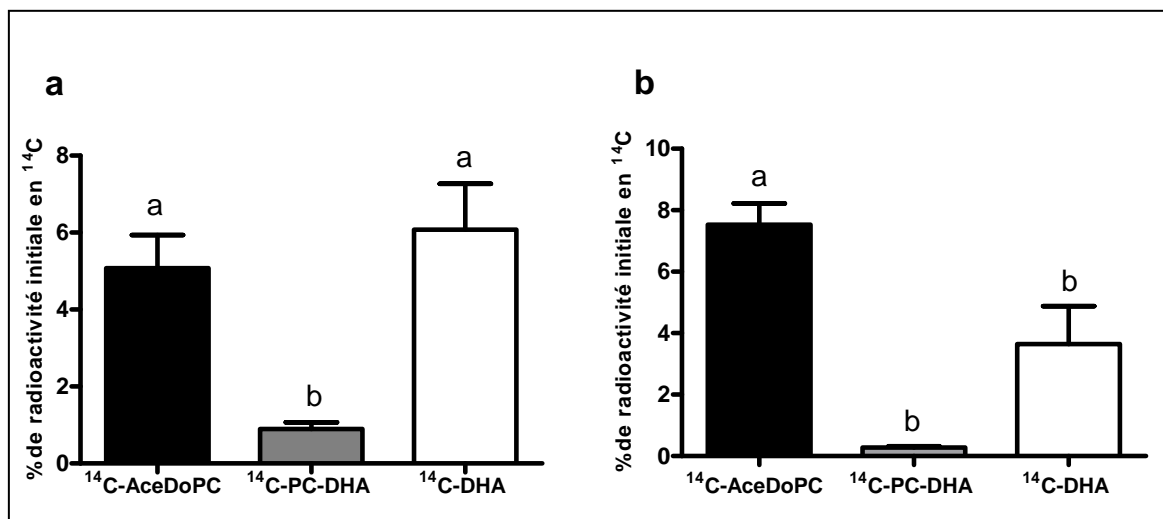


Figure 40: Radioactivité des lipides totaux des cellules endothéliales et des cellules gliales.

Avant incubation avec les substrats marqués, les milieux de culture ont été remplacés par du DMEM sans sérum pendant 4 heures à 37°C (période de pré-incubation). A la fin de la période de pré-incubation, le milieu luminal (supérieur) a été remplacé par du DMEM contenant du [¹⁴C]-DHA non estérifié, de la [¹⁴C]-PC-DHA ou de l' [¹⁴C]-AceDoPC (0,1 µCi, 5 µM) préalablement lié au plasma. Les incubations ont été effectuées à 37°C pendant 4 heures. Les milieux ont été prélevés et les cellules ont été rincées puis récupérées par grattage. Les lipides totaux des milieux et des cellules ont été extraits et la radioactivité a été quantifiée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité initiale en ¹⁴C et représentent la moyenne ± SEM de quatre valeurs. Les groupes ont été comparés par une analyse de variance (ANOVA) suivie par un test de Bonferroni. Les données avec différentes lettres sont significativement différentes à P < 0,05.

Quelque soit la forme d'apport du DHA, la radioactivité des phases aqueuses après extraction lipidique, est faible dans tous les compartiments étudiés : milieu supérieur (1,8 ± 0,2), cellules endothéliales (0,16), milieu inférieur (0,43 ± 0,06) et cellules gliales (1,2 ± 0,06 % de la radioactivité initiale).

Ces valeurs, qui sont souvent à la limite des techniques d'extraction et de détection employées, suggèrent que dans nos conditions, l'oxydation du DHA est probablement très faible.

I.2.3 Passage total des substrats à travers la monocouche endothéliale 4h après ajout de [^{14}C]-DHA non estérifié, [^{14}C]-PC-DHA ou de [^{14}C]-AceDoPC dans le milieu supérieur des co-cultures

Le passage total à travers la monocouche de cellules endothéliales, correspondant à la somme des radioactivités retrouvées dans les milieux inférieurs et les cellules gliales, est représenté par la figure 41.

La préférence pour l'AceDoPC étant observée à la fois dans les astrocytes et dans le milieu inférieur, l'AceDoPC apparaît clairement comme la forme la plus efficace de transport de DHA à travers le modèle *in vitro* de BHE (15,0 \pm 1,2 % pour l'AceDoPC ; 8,2 \pm 1,4 % pour la DHA et 4,2 \pm 0,4 % pour la PC-DHA).

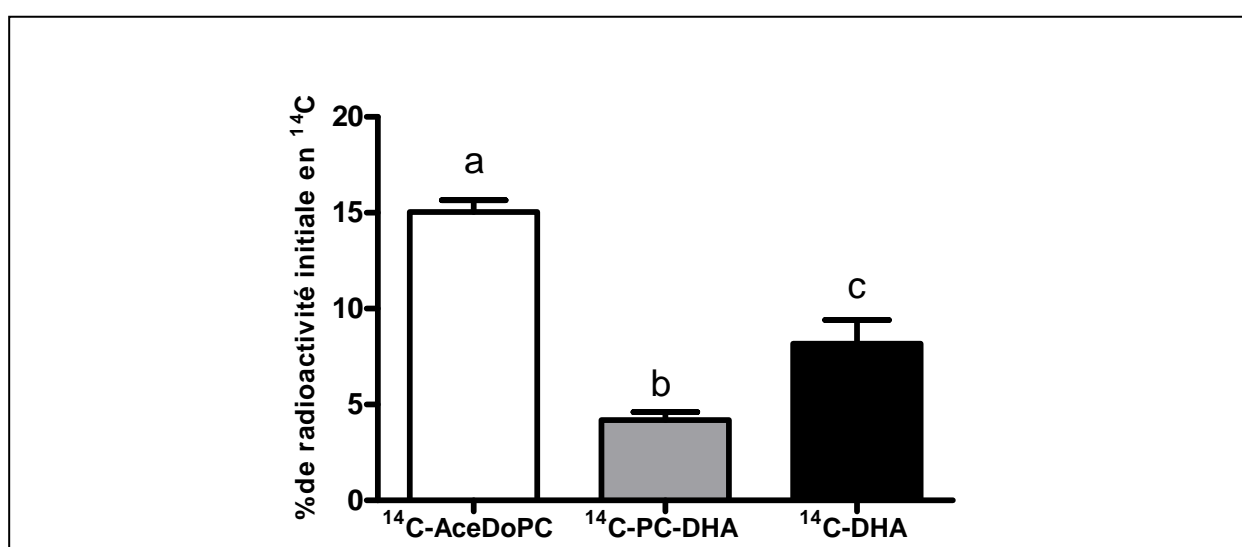


Figure 41: Passage total des lipides à travers la BHE (somme de la radioactivité retrouvée dans le milieu inférieur et les cellules gliales).

Avant incubation avec les substrats marqués, les milieux de culture ont été remplacés par du DMEM sans sérum pendant 4 heures à 37°C (période de pré-incubation). A la fin de la période de pré-incubation, le milieu luminal (supérieur) a été remplacé par du DMEM contenant du [^{14}C]-DHA non estérifié, de la [^{14}C]-PC-DHA ou de l' [^{14}C]-AceDoPC (0,1 μCi , 5 μM) préalablement lié au plasma. Les incubations ont été effectuées à 37°C pendant 4 heures. Les milieux ont été prélevés et les cellules ont été rincées puis récupérées par grattage. Les lipides totaux des milieux et des cellules ont été extraits et la radioactivité a été quantifiée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité initiale en ^{14}C et représentent la moyenne \pm SEM de quatre valeurs. Les groupes ont été comparés par une analyse de variance (ANOVA) suivie par un test de Bonferroni. Les données avec différentes lettres sont significativement différentes à $P < 0,05$.

Quelque soit la forme d'apport du DHA, dans les filtres de l'insert, un faible pourcentage de radioactivité est retrouvé suggérant ainsi que ces filtres ne sont pas restrictifs.

I.3 Distribution de la radioactivité entre les différentes classes des lipides des milieux

Les figures 42 et 43 illustrent la distribution de la radioactivité parmi les classes lipidiques les plus marquées des milieux supérieur et inférieur.

Après incubation des cellules avec l'AceDoPC, la radioactivité est essentiellement associée à la fraction lysoPC, que ce soit dans le milieu supérieur (figure 42.a) ou inférieur (figure 43.a) (64% et 57%, respectivement). 27% de la radioactivité lipidique du milieu supérieur et 36 % de celle du milieu inférieur est localisée dans la fraction acide gras libre (AGL). Un pourcentage plus faible de radioactivité est observé dans la fraction AceDoPC. Ces résultats suggèrent que l'AceDoPC est capable de traverser la BHE, en partie, sous forme intacte, et que la molécule est aussi clivée majoritairement en lysoPC et secondairement en libérant le DHA. Au contraire, la radioactivité des milieux supérieur et inférieur est retrouvée presque exclusivement dans la fraction AGL ou PC après incubation avec du DHA non estérifié (figure 42.c et 43.c) ou de la PC-DHA (figure 42.b et 43.b).

Ces observations suggèrent que le DHA et la PC-DHA sont captés par les cellules endothéliales puis transférés sans modification dans le milieu inférieur tandis que la molécule d'AceDoPC est hydrolysée en partie en lysoPC avec libération également de DHA.

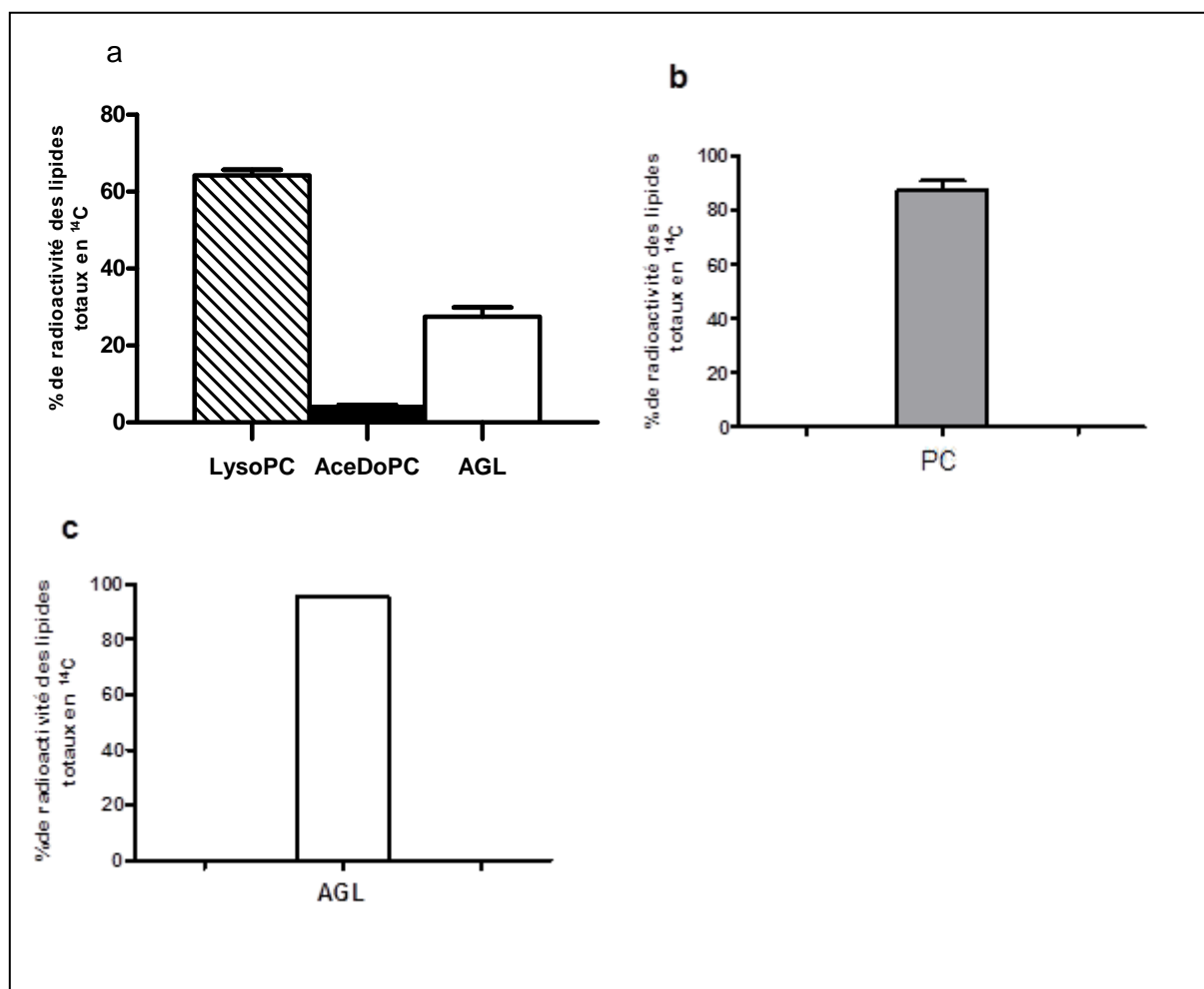


Figure 42: *Distribution de la radioactivité parmi les classes lipidiques les plus marquées du milieu supérieur*

Avant incubation avec les substrats marqués, les milieux de culture ont été remplacés par du DMEM sans sérum pendant 4 heures à 37°C (période de pré-incubation). A la fin de la période de pré-incubation, le milieu luminal (supérieur) a été remplacé par du DMEM contenant (a) de l' [^{14}C]-AceDoPC, (b) de la [^{14}C]-PC-DHA ou (c) du [^{14}C]-DHA non estérifié (0,1 μCi , 5 μM) préalablement lié au plasma. Les incubations ont été effectuées à 37°C pendant 4 heures. Les milieux ont été prélevés et les cellules ont été rincées puis récupérées par grattage. Les lipides totaux des milieux ont été extraits, les différentes classes de lipides ont été séparées par CCM et la radioactivité a été quantifiée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité des lipides totaux et représentent la moyenne \pm SEM de quatre valeurs.

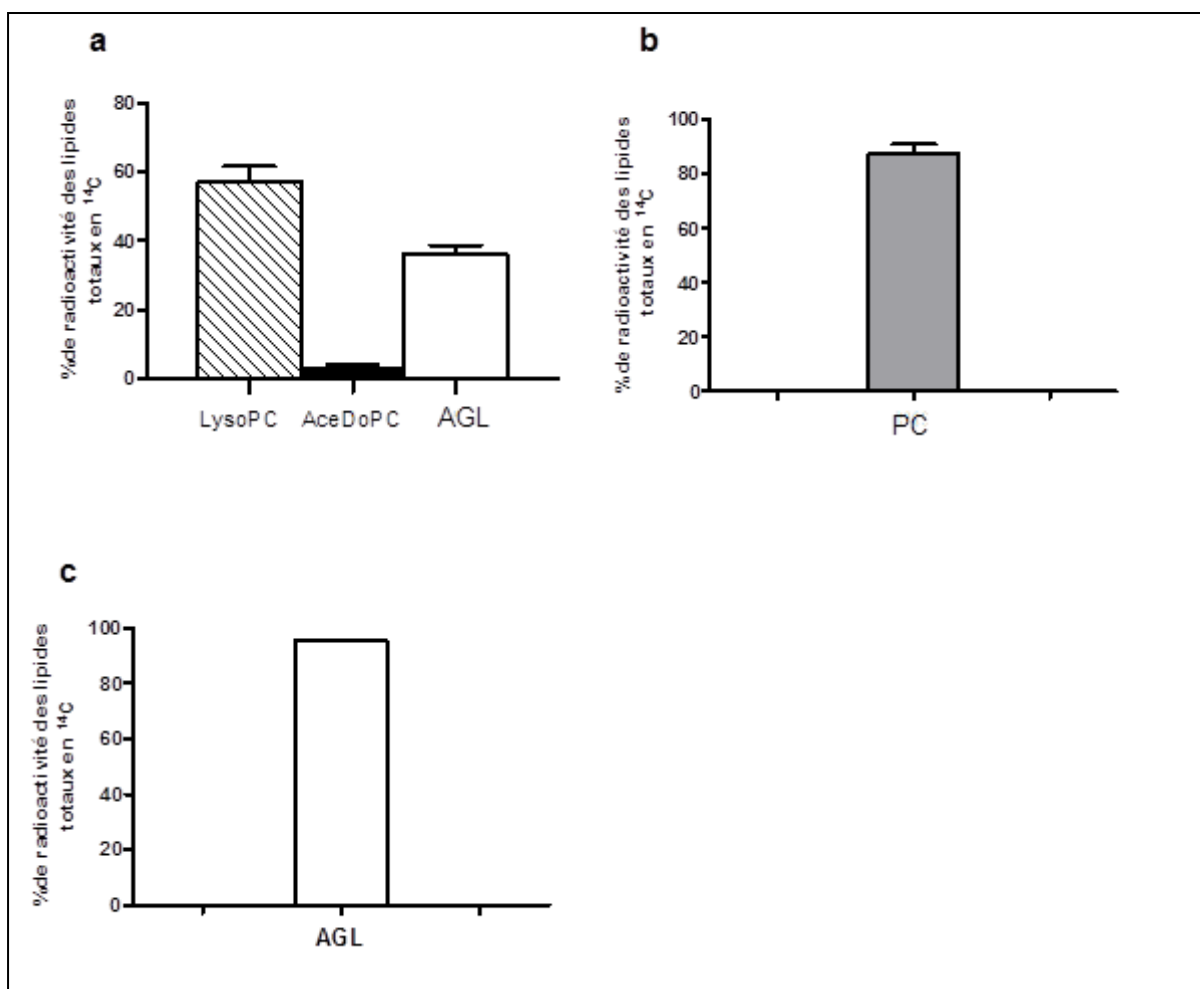


Figure 43: *Distribution de la radioactivité parmi les classes lipidiques les plus marquées du milieu inférieur.*

Avant incubation avec les substrats marqués, les milieux de culture ont été remplacés par du DMEM sans sérum pendant 4 heures à 37°C (période de pré-incubation). A la fin de la période de pré-incubation, le milieu luminal (supérieur) a été remplacé par du DMEM contenant (a) de l' [^{14}C]-AceDoPC, (b) de la [^{14}C]-PC-DHA ou (c) du [^{14}C]-DHA non estérifié (0,1 μCi , 5 μM) préalablement lié au plasma. Les incubations ont été effectuées à 37°C pendant 4 heures. Les milieux ont été prélevés et les cellules ont été rincées puis récupérées par grattage. Les lipides totaux des milieux ont été extraits, les différentes classes de lipides ont été séparées par CCM et la radioactivité a été quantifiée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité des lipides totaux et représentent la moyenne \pm SEM de quatre valeurs.

I.4 Répartition de la radioactivité entre les différentes classes des lipides cellulaires (endothéliales et gliales)

Le devenir métabolique du [^{14}C] -DHA et de l' [^{14}C] -AceDoPC a été également déterminé dans les cellules gliales (figure 44) et les cellules endothéliales (figure 45) après incubation de [^{14}C] -DHA ou de [^{14}C] -AceDoPC. Le passage du DHA à partir de [^{14}C] -PC-DHA à travers la BHE étant faible, la radioactivité retrouvée dans les cellules n'était pas suffisante pour détecter un marquage significatif dans les différentes classes de lipides des cellules endothéliales et gliales.

Dans les cellules gliales et endothéliales, les PE et PC sont les classes lipidiques les plus marquées après incubation avec de l' AceDoPC (figure 44.a et 45.a). Une partie du marquage est observé dans la fraction AceDoPC (moins de 10% dans les deux types cellulaires), suggérant que la majorité (environ 80%) du DHA initialement présent dans l' AceDoPC est libéré et ré-acylé dans les PC et les PE (environ 70%), et en plus faible proportion dans la fraction contenant les lipides neutres (LN) et les acides gras libres (AGL) (respectivement 10% et 17% dans les cellules endothéliales et les cellules gliales). La radioactivité est également présente sous forme de lysoPC (10% dans les cellules endothéliales et 3% dans les cellules gliales). Ceci indique que l' AceDoPC pourrait également perdre son groupement acétyle.

Les profils obtenus après incubation de DHA non estérifié sont différents de ceux obtenus après incubation d' AceDoPC. Comme attendu, seules les PC et les PE, ainsi que la fraction LN+AGL, sont marqués. Cependant, des différences substantielles peuvent être observées entre les deux types cellulaires. En effet, les PE représentent la classe lipidique la plus marquée dans les lipides des cellules gliales (figure 44.b) alors qu'il s'agit des PC dans les cellules endothéliales (figure 45.b).

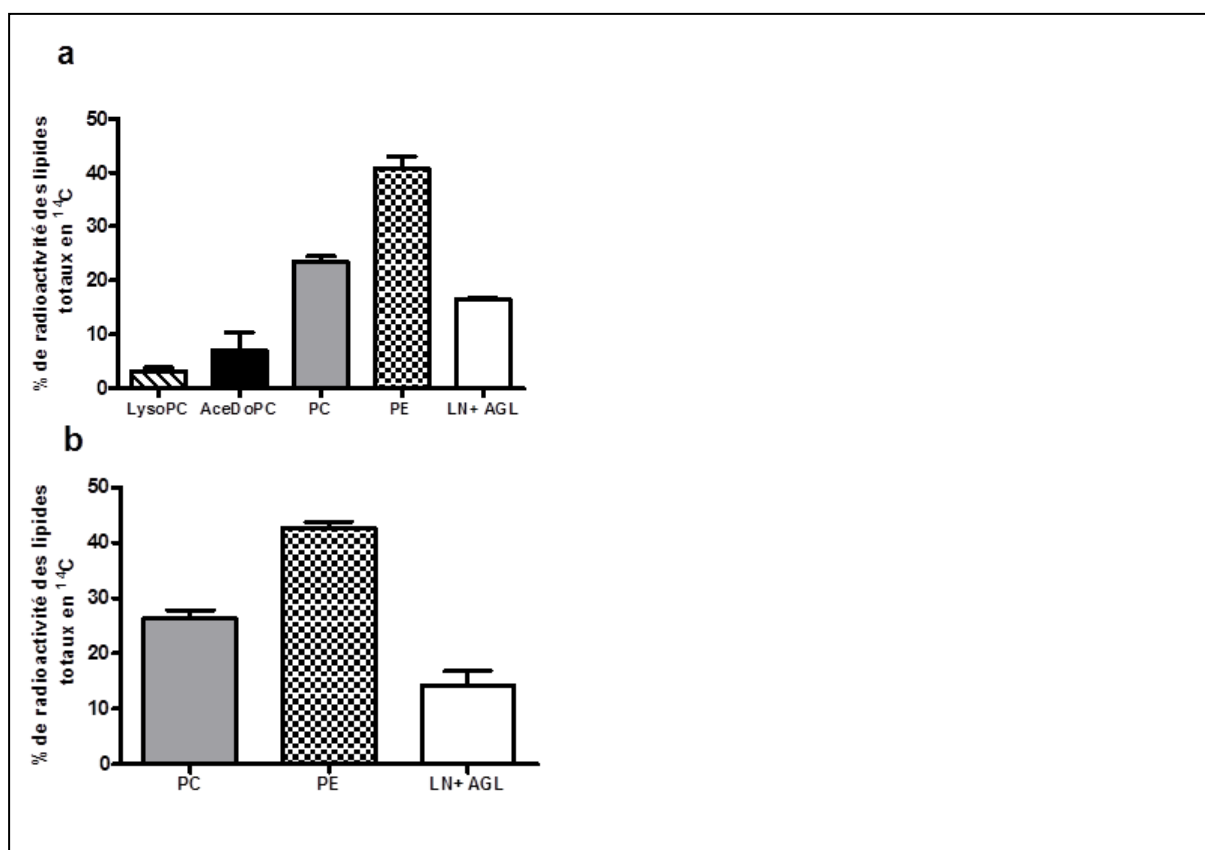


Figure 44: *Distribution de la radioactivité parmi les classes lipidiques les plus marquées des cellules gliales.*

4 heures après incubation avec (a) du $[^{14}\text{C}]$ -AceDoPC, (b) de $[^{14}\text{C}]$ -DHA, les lipides des cellules gliales sont extraits et les différentes classes lipidiques sont séparés par chromatographie sur couche mince (gel de silice G de 0,75 mm) en utilisant un système d'élution: chloroforme / méthanol / solution aqueuse de méthylamine (40%) (60/20/5, v/v/v). La radioactivité des classes de lipides est déterminée par scintillation liquide. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale ^{14}C , présentés en tant que \pm SEM de quatre valeurs.

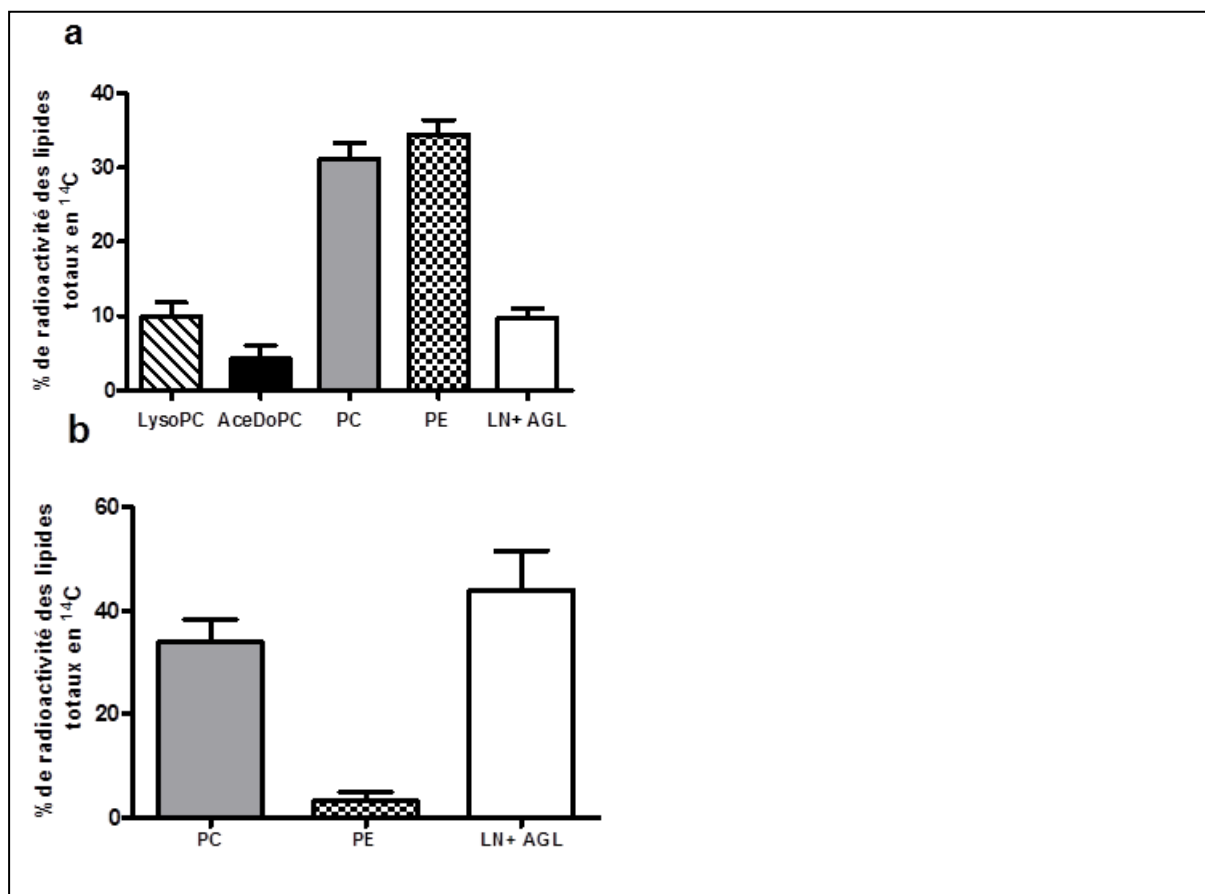


Figure 45: *Distribution de la radioactivité parmi les classes lipidiques les plus marquées des cellules endothéliales.*

4 heures après incubation avec (a) du $[^{14}\text{C}]$ -AceDoPC, (b) de $[^{14}\text{C}]$ -DHA, les lipides des cellules endothéliales sont extraits et les différentes classes lipidiques sont séparés par chromatographie sur couche mince (gel de silice G de 0,75 mm) en utilisant un système d'élution: chloroforme / méthanol / solution aqueuse de méthylamine (40%) (60/20/5, v/v/v). La radioactivité des classes de lipides est déterminée par scintillation liquide. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité totale ^{14}C , présentés en tant que \pm SEM de quatre valeurs.

I.5 Discussion

Le DHA est indispensable au développement cérébral et possède des effets neuroprotecteurs comme discuté précédemment dans la partie « rappels bibliographiques ». En tant que structure-clé dans la régulation des échanges entre le compartiment sanguin et le parenchyme cérébral, la BHE empêche un grand nombre de médicaments potentiels d'atteindre leur cible (Pardridge, 2005). C'est une des contraintes dans les étapes du processus de découverte des molécules à visée thérapeutiques cérébrales et pour répondre à cette question, les modèles *in vitro* de BHE représentent une alternative à l'utilisation massive d'animaux à des fins expérimentales. Les modèles de coculture unissant des cultures primaires de cellules endothéliales cérébrales et de cellules gliales sont reconnus comme reproduisant fidèlement la BHE *in vivo* (Cecchelli et al., 2007). Notre travail de recherche visait à déterminer si l'AceDoPC représente une forme privilégiée de passage du DHA à travers un modèle *in vitro* de BHE comparativement à d'autres formes d'apport du DHA, comme l'est la lysoPC.

Une partie importante du travail a été de synthétiser l'AceDoPC et la PC-DHA marquées au [^{14}C]-DHA avec une activité spécifique suffisante pour l'étude du passage à travers la BHE.

La non toxicité des molécules marquées sur les cellules endothéliales de la BHE a été confirmée en contrôlant l'intégrité de la BHE et ceci en incubant les cellules avec du jaune Lucifer, une petite molécule hydrophile ayant une faible pénétration cérébrale.

Nos résultats indiquent que la BHE reconstituée *in vitro* favorise le passage du DHA estérifié dans l'AceDoPC comparativement au DHA estérifié dans la PC-DHA et au DHA non estérifié avec un transfert plus important de l'AceDoPC dans le milieu inférieur et une captation préférentielle par les cellules gliales. Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux captent de façon similaire le DHA non estérifié et l'AceDoPC mais exportent préférentiellement l'AceDoPC dans le milieu inférieur suggérant un contrôle du transfert à travers la monocouche endothéliale. La captation de la PC-DHA par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux est la plus faible comparativement au DHA non estérifié ou au DHA estérifié dans l'AceDoPC.

En analysant la distribution de la radioactivité dans les différentes classes lipidiques extraites du milieu supérieur après incubation avec l'AceDoPC, nous avons montré que, en plus de l'AceDoPC, la radioactivité est liée à la fraction lysoPC-DHA et à la fraction acides gras libres. La formation de lysoPC-DHA résulterait d'une activité spécifique des cellules de la BHE puisque l'incubation de l'AceDoPC en présence de plasma et de milieu DMEM mais sans cellules, n'altère pas sa structure. En effet, l'AceDoPC pourrait être hydrolysée par une activité phospholipase PLA₁, libérant la lysoPC-DHA. La lysoPC-DHA pourrait notamment être produite *via* l'action de la lipase endothéliale, une enzyme possédant une activité PLA₁ qui est exprimée et sécrétée par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Sovic et al., 2005) et qui présente une préférence pour les phospholipides contenant du DHA en position *sn*-2 (Chen et Subbaiah, 2007). Il est intéressant de noter que Subbaiah et son équipe ont testé l'hydrolyse *in vitro* de l'AceDoPC par la lipase endothéliale et ont montré que 10% de la molécule étaient hydrolysés (résultats non publiés). Cependant, aucune hydrolyse de PC-DHA n'est observée dans les milieux supérieurs après incubation des cellules avec de la PC-DHA. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre la formation de lysoPC-DHA dans le milieu des cellules. La formation de lysoPC-DHA est très intéressante car il a été précédemment montré, d'une part, un passage préférentiel de cette forme à travers la BHE comparativement au DHA non estérifié (Bernoud et al., 1999) et,

d'autre part, la présence d'un transporteur spécifique (Mfsd2a) de la lysoPC-DHA au niveau de la BHE (Nguyen et al., 2014). La présence de DHA non estérifié dans le milieu supérieur pourrait être, quant à elle, due à une hydrolyse spontanée de la lysoPC-DHA ou au métabolisme cellulaire.

Le DHA provenant de l'AceDoPC est principalement incorporé dans les PE et les PC des cellules gliales et des cellules endothéliales, les PE étant davantage marquées que les PC, particulièrement dans les cellules gliales. L'AceDoPC peut être hydrolysée par des activités PLA₁ ou PLA₂, libérant, respectivement, la lysoPC-DHA et le DHA non estérifié, suivi d'une réacylation en PC ou une réincorporation dans d'autres phospholipides. L'acylation directe des lysoPC produites à partir de l'AceDoPC est en accord avec des travaux antérieurs (Thiès et al., 1992 ; Morash et al., 1989). Une partie de la radioactivité retrouvée dans les cellules est liée également à l'AceDoPC sous forme de molécule entière. L'analyse des classes lipidiques les plus marquées du milieu inférieur après incubation d'AceDoPC montre aussi qu'une partie du marquage est retrouvée dans l'AceDoPC suggérant que l'AceDoPC est capable de traverser la BHE sous forme intacte. Bernoud et al. (1999) ont montré que le passage de lysoPC-DHA à travers la barrière endothéliale était diminué lorsque les astrocytes étaient enlevés et que la préférence pour les lysoPC-DHA était inversée à l'avantage de la forme non estérifiée du DHA quand un (ou des) accepteur(s) de lipides, comme de l'albumine ou du sérum, étaient ajoutés dans le milieu inférieur. L'ensemble de ces observations suggéraient fortement que le passage des formes d'apport et la préférence pour la lysoPC-DHA résultaient à la fois d'une libération de substances (probablement des transporteurs possédant une affinité particulière pour les lysoPC) et d'une captation préférentielle par les astrocytes. Ces auteurs ont effectivement mis en évidence que les astrocytes peuvent sécréter des lipoprotéines à apolipoprotéine E (résultats non publiés). De nombreuses études ont mis en évidence le rôle important des astrocytes dans la synthèse et la libération des lipoprotéines naissantes contenant de l'apolipoprotéine E et de l'apolipoprotéine J dans leur milieu de culture (Pitas et al., 1987 ; Patel et al., 1995 ; LaDu et al., 1998). La même hypothèse peut être formulée pour l'AceDoPC et la nature de ces transporteurs devrait être étudiée.

En conclusion, nous avons montré un passage préférentiel de l'AceDoPC comparativement au DHA non estérifié et au DHA estérifié dans une PC à travers un modèle *in vitro* de la BHE et que l'AceDoPC traversait, en partie, la monocouche de cellules endothéliales sous forme de lysoPC-DHA. La stratégie que nous avons utilisée est l'acétylation de la position *sn-1* de la lysoPC pour maintenir la partie docosahexaénoyl en position *sn-2* qui est la position physiologique du DHA dans les tissus.

Chapitre 2: Etude *in vivo* de captation cérébrale du DHA non estérifié ou estérifié (AceDoPC, PC-DHA)

Les résultats obtenus sur le modèle *in vitro* de BHE montrant un passage préférentiel de l'AceDoPC à travers la monocouche endothéliale, nous avons par la suite recherché si cette préférence cérébrale était observée *in vivo*. L'étude a été réalisée chez des rats âgés de 20 jours. Après injections intraveineuses dans la queue des rats avec les molécules marquées (100 nmoles de [^{14}C]-DHA ou de [^{14}C]-AceDoPC, 0,5 μCi) préalablement incubées dans du plasma de rat), les rats ont été sacrifiés 15min, 1h, 6h, 24h et 48h post-injection, et le plasma et les organes (cerveau, yeux, cœur et foie) ont été prélevés.

I.1 Cinétique d'incorporation du DHA apporté sous formes de DHA ou d'AceDoPC dans le plasma

La figure 46 montre la cinétique de la radioactivité mesurée dans le plasma après injection intraveineuse de [^{14}C]-DHA ou de [^{14}C]-AceDoPC, les deux formes étant préalablement liées aux protéines plasmatiques.

La cinétique des deux formes d'apport est similaire avec deux phases : une première phase très rapide pendant les 6 premières heures et une seconde phase très lente atteignant un plateau 24 h après injection.

La radioactivité retrouvée dans le plasma est de 10% et 5% 15min après injection respective d'AceDoPC et de DHA non estérifié mais seulement de 1% et de 0,8% respectivement 24h après injection.

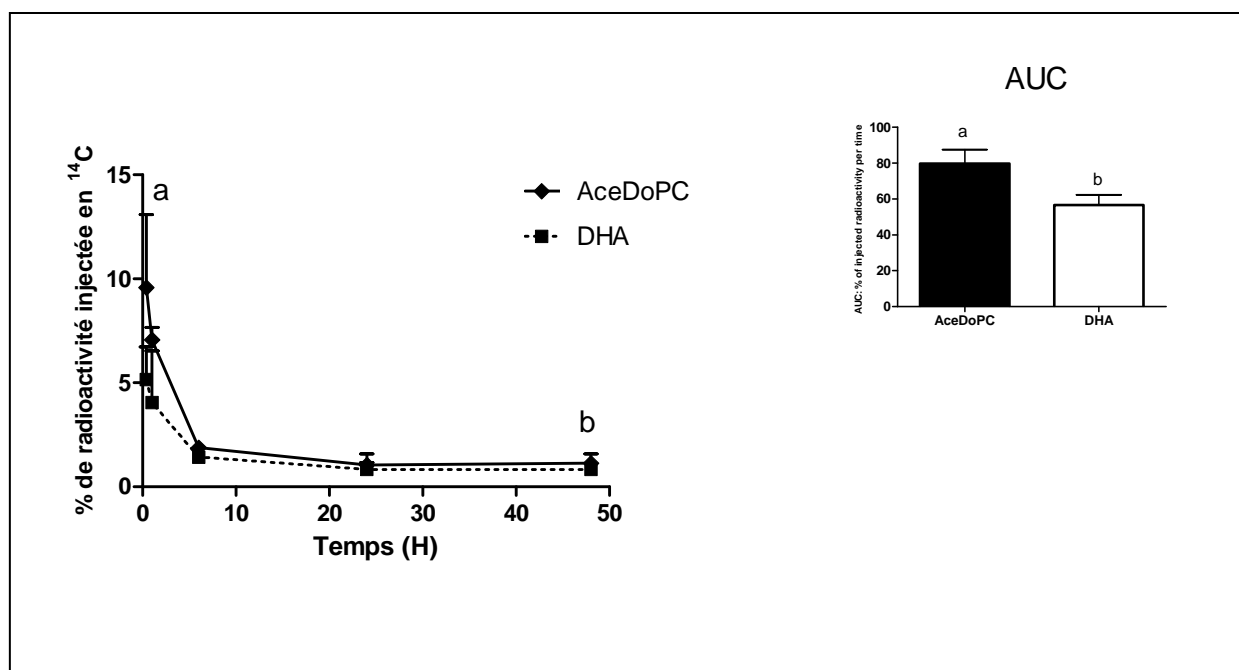


Figure 46: Cinétique d'incorporation du DHA dans les lipides totaux du plasma chez des rats âgés de 20 jours après injection du [^{14}C]-AceDoPC ou de [^{14}C]-DHA non estérifié lié au plasma.

1mM (100 μl) de la solution marquée a été injectée dans la veine de la queue du rat, puis les rats ont été sacrifiés 15min, 1h, 6h, 24h et 48h après injection. Le sang a été transféré dans des tubes contenant de l'héparine comme anticoagulant, ensuite centrifugé à 2600g pendant 10min. Les lipides totaux du plasma ont été extraits. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois valeurs et ont été analysés en utilisant le logiciel Prism. L'aire sous la courbe (AUC) est exprimée en % de la radioactivité injectée par unité de temps. Les données avec différentes lettres en exposant sont significativement différentes à $P < 0,05$ d'après l'analyse de variance (ANOVA), suivie par le test de Bonferroni.

Nos résultats suggèrent que le taux de DHA plasmatique diminue en fonction du temps avec distribution par la suite aux différents tissus que ce soit après injection d'AceDoPC ou de DHA non estérifié.

I.2 Cinétique d'incorporation du DHA apporté sous formes de DHA ou d'AceDoPC dans les organes

Les cinétiques de la radioactivité retrouvée dans les lipides totaux des différents organes après injection de [^{14}C]-DHA ou d' [^{14}C]-AceDoPC sont représentées dans la figure 47.

Dans le cerveau (figure 47.a), le pourcentage de la radioactivité retrouvé est 2 à 2,5 fois plus élevé après injection d'AceDoPC qu'après injection de la forme non estérifié du DHA (avec une différence significative de l'aire sous la courbe (AUC) entre les deux formes d'apport du DHA). Une augmentation de l'incorporation du DHA injecté sous ces 2 formes (estérifiée ou non) est observée en fonction du temps. 15min et 48h après injection, les pourcentages de radioactivité initiale injectée sont respectivement 0,58 +/- 0,08% et 1,24 +/- 0,13% pour l'AceDoPC. Après injection du DHA non estérifié, les pourcentages correspondants sont 0,29 +/- 0,1% et 0,57 +/- 0,05 %.

Au contraire, cette préférence pour l'AceDoPC n'est pas observée dans les autres organes étudiés.

Dans le cœur (figure 47.b), entre 15min et 6h, la proportion de radioactivité mesurée après injection d'AceDoPC est même plus basse pour l'AceDoPC que pour le DHA. De plus, une diminution de la radioactivité est observée en fonction du temps après injection du DHA, alors qu'une augmentation de l'incorporation du DHA est notée 24h et 48h après injection d'AceDoPC.

Dans les yeux (figure 47.c) et le foie (figure 47.d), les pourcentages de radioactivité retrouvés provenant de l'AceDoPC sont similaires à ceux obtenus après injection de DHA non estérifié. Les résultats montrent également une diminution de la radioactivité dans les lipides du foie en fonction du temps après injection des deux formes d'apport de DHA mais une augmentation dans les lipides des yeux jusqu'à 6h après injection.

Nos résultats montrent que seul le cerveau montre une préférence de captation du DHA lorsqu'il est apporté sous forme d'AceDoPC et que les autres organes (le foie, les yeux, le cœur) captent d'une façon similaire le DHA estérifié dans l'AceDoPC et la forme non estérifiée du DHA.

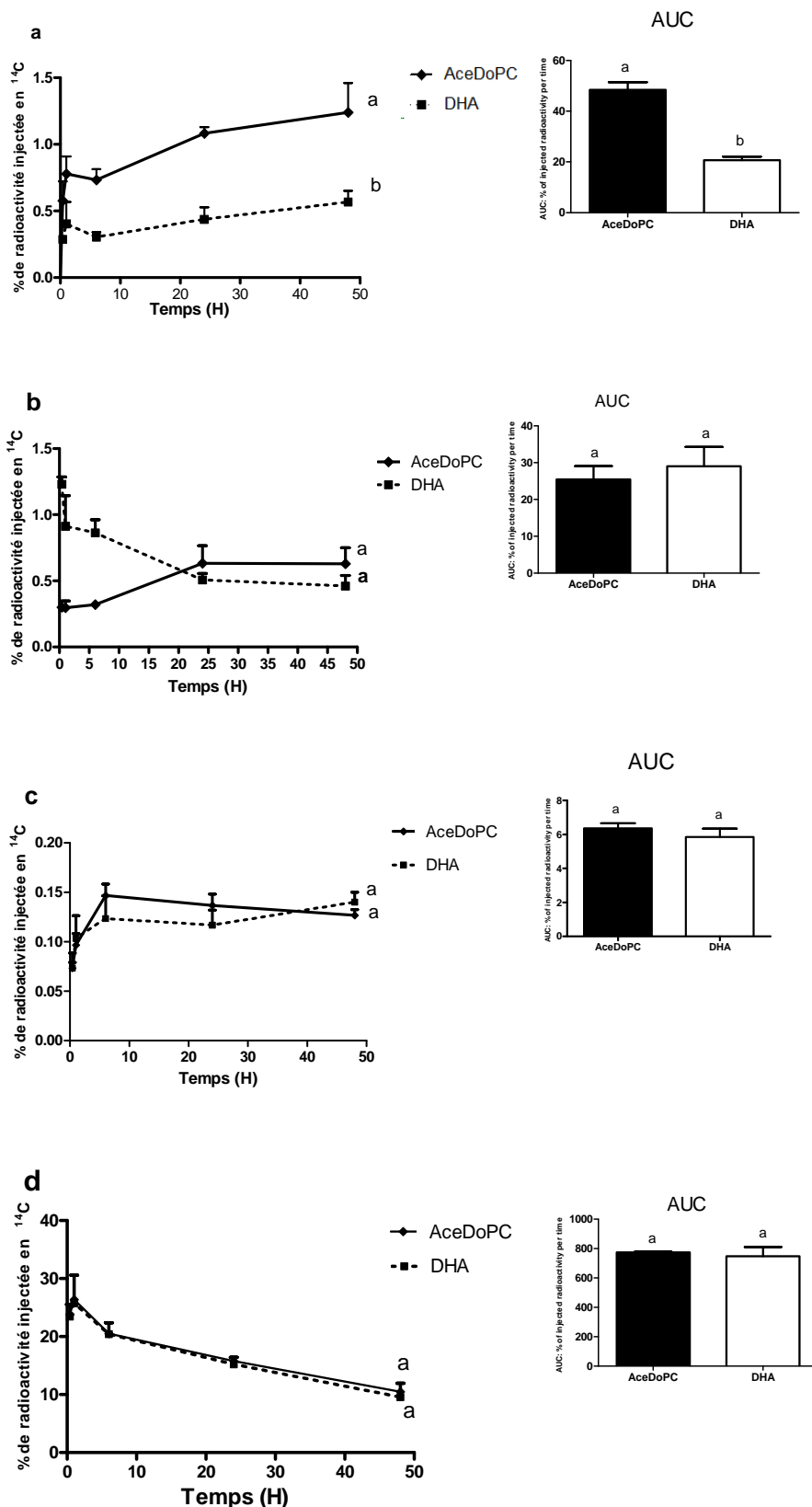


Figure 47: Cinétique d'incorporation du DHA dans les lipides totaux des organes ((a) le cerveau, (b) le cœur, (c) les yeux et (d) le foie), chez des rats âgés de 20 jours après injection de [^{14}C]-AceDoPC ou de [^{14}C]-DHA non estérifié lié au plasma.

1mM (100 µl) de la solution marquée a été injecté dans la veine de la queue du rat, puis les rats ont été sacrifiés 15min, 1h, 6h, 24h et 48h après injection. Les organes: le cerveau (a), le cœur (b), les yeux (c) et le foie (d) ont été prélevés. Les lipides totaux des organes ont été extraits en utilisant la méthode de Bligh et Dyer. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois valeurs et ont été analysés en utilisant le logiciel Prism. L'aire sous la courbe (AUC) est exprimée en % de la radioactivité injectée par unité de temps. Les données avec différentes lettres en exposant sont significativement différentes à $P < 0,05$ d'après l'analyse de variance (ANOVA), suivie par le test de Bonferroni.

I.3 Distribution de la radioactivité entre les différentes classes des lipides extraits des organes après injection d' [^{14}C]-AceDoPC ou de [^{14}C]-DHA

Les figures (48 et 49) représentent respectivement la répartition de la radioactivité entre les classes lipidiques extraites des organes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la radioactivité initiale injectée en ^{14}C . Nos résultats montrent encore des différences importantes entre le cerveau, le cœur et le foie.

La radioactivité retrouvée dans les yeux de rats après injection d' [^{14}C]-AceDoPC ou de [^{14}C]-DHA est trop faible pour détecter un marquage significatif dans les différentes classes lipidiques de cet organe.

Dans le cerveau, nous avons examiné la radioactivité de DHA dans les différentes classes de lipides 1h, 24h et 48h post-injection de [^{14}C]-AceDoPC (figure 48.a). L'AceDoPC est la classe lipidique la plus marquée 1h après injection d'AceDoPC (représentant 75 \pm 8% de la radioactivité totale des lipides cérébraux) indiquant que cette forme stabilisée de lysoPC-DHA entre dans le cerveau sous forme intacte comme suggéré par nos expériences réalisées sur le modèle de BHE *in vitro*. La radioactivité liée à la fraction AceDoPC diminue avec le temps alors que la radioactivité des PC et PE augmente progressivement ce qui suggère que le DHA est libéré à partir d'AceDoPC puis réacylé dans les PC et PE. Si la radioactivité retrouvée dans les PC est comparable entre 24 et 48h, celle mesurée dans les PE double ce qui est en faveur d'une ré-acylation en premier lieu du DHA dans les PC puis d'une redistribution du DHA radioactif dans les phospholipides cérébraux en fonction du temps. Un faible pourcentage de la radioactivité est retrouvé dans la fraction LN ainsi que dans la fraction lysoPC.

Dans le cœur, on note une situation très différente avec l'AceDoPC qui est minoritairement présent en tant que molécule entière dans cet organe dès 1h post-injection alors qu'on a une redistribution comparable du DHA radioactif dans les autres classes lipidiques, PC, PE et LN+AGL (figure 48.b). On observe également une augmentation de la radioactivité dans ces classes lipidiques entre 1h et 24h mais plus de changement significatif entre 24 et 48h.

Dans le foie (figure 48.c), les PC et PE sont les classes lipidiques les plus marquées après injection d'AceDoPC et le marquage diminue en fonction du temps.

Après injection de DHA non estérifié, PE est la classe lipidique la plus marquée dans les trois organes étudiés 1 heure après injection (figure 49.a, 49.b, 49.c). A l'exception du cerveau, la radioactivité des PE diminue en fonction du temps. La radioactivité est également observée dans la fraction LN+AGL dans les trois organes, mais seulement 1 heure après injection

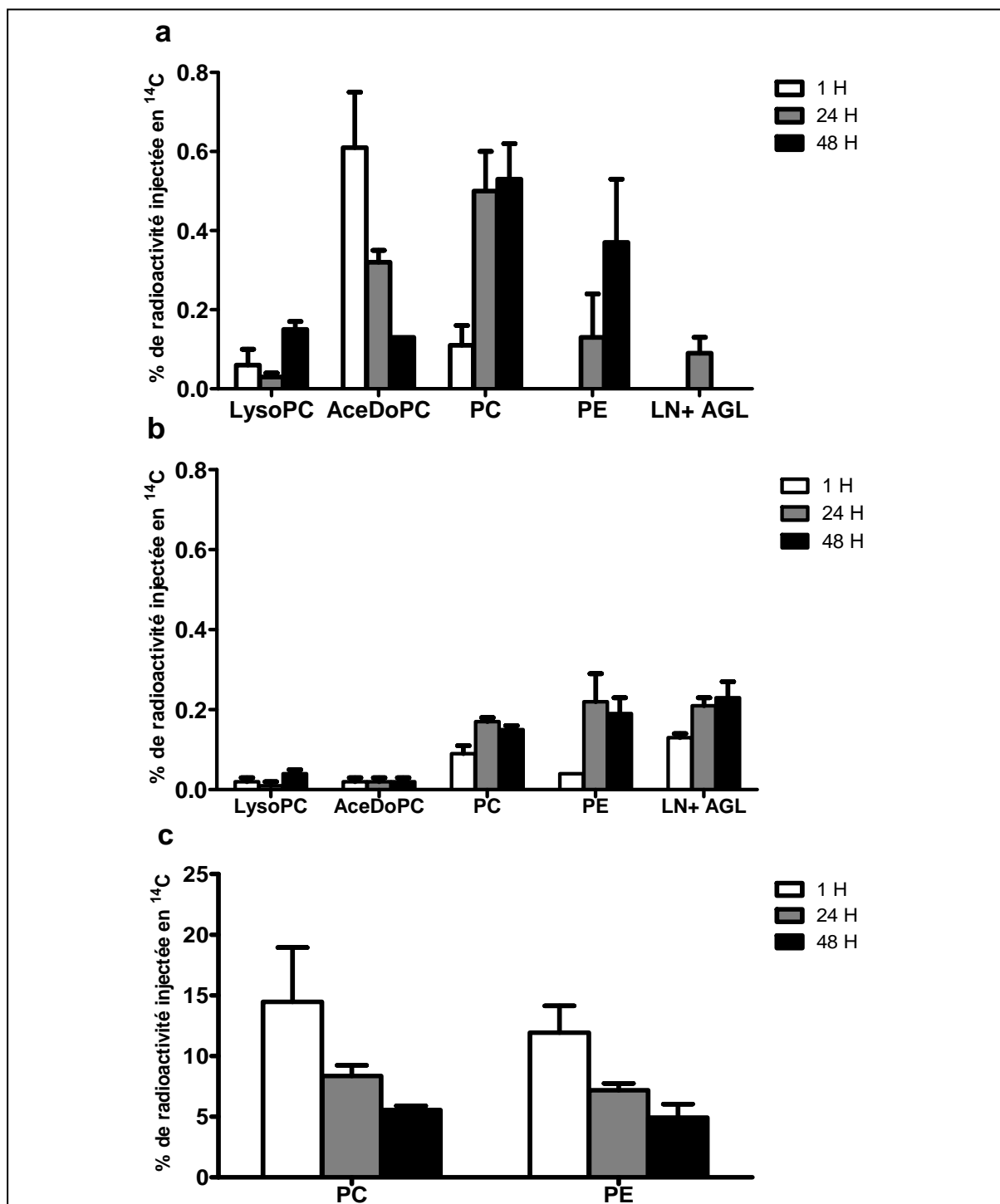


Figure 48: Distribution de la radioactivité dans les différentes classes de lipides extraits des organes en fonction du temps après injection intraveineuse de [^{14}C]-AceDoPC

1h (barres ouvertes), 24h (barres grises), 48h (barres noires) dans (a) le cerveau, (b) le cœur et (c) le foie. LysoPC, AceDoPC, PC, PE, LN+AGL ont été identifiés. Les classes de lipides ont été séparées par chromatographie sur couche mince (gel de silice G de 0,75 mm) par un système d'élution: chloroforme / méthanol / solution aqueuse de méthylamine (40%) (60/20/5, v/v/v). Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois valeurs.

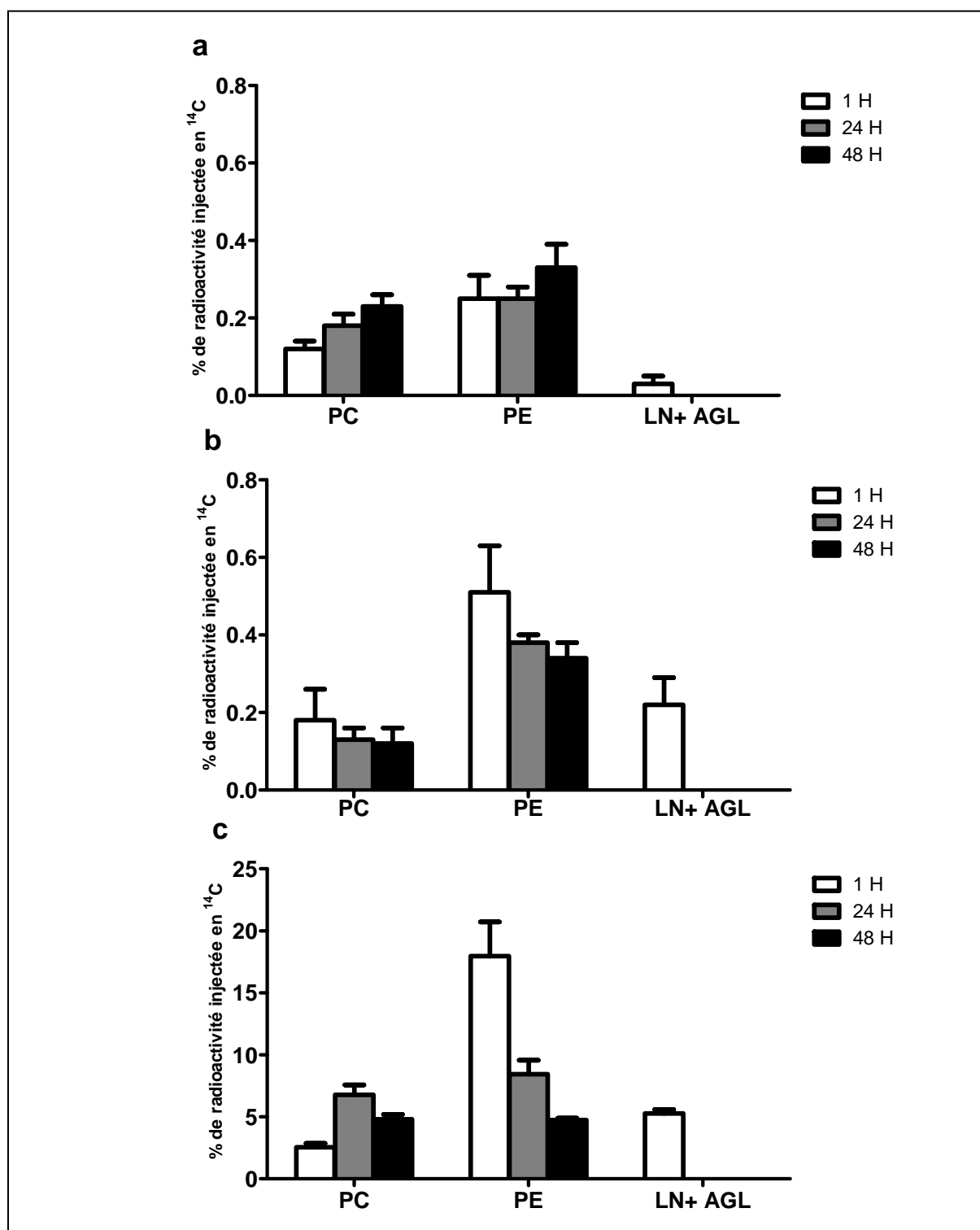


Figure 49: Distribution de la radioactivité dans les différentes classes de lipides extraits des organes en fonction du temps après injection intraveineuse de [^{14}C]-DHA

1h (barres ouvertes), 24h (barres grises), 48h (barres noires) dans (a) le cerveau, (b) le cœur et (c) le foie. LysoPC, AceDoPC, PC, PE, LN+ AGL ont été identifiés. Les classes de lipides ont été séparées par chromatographie sur couche mince (gel de silice G de 0,75 mm) par un système d'élution: chloroforme / méthanol / solution aqueuse de méthylamine (40%) (60/20/5, v/v/v). Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois valeurs.

I.4 Comparaison de l'incorporation du DHA apporté sous formes de DHA, AceDoPC ou PC-DHA dans le plasma et les organes

I.4.1 Comparaison de l'incorporation du DHA apporté sous formes de DHA, AceDoPC ou PC-DHA dans le plasma

Dans les aliments, le DHA se trouve principalement sous forme de triglycérides ou de phospholipides qui sont les deux classes lipidiques naturelles. Des études ont rapporté une plus grande efficacité de PC par rapport aux TG concernant l'accrétion cérébrale du DHA (Liu et al., 2014 ; Graf et al., 2010). Pour cette raison, nous avons comparé la captation par les organes de DHA estérifié dans une PC, à deux temps différents de la cinétique : un temps court, 1h, et un temps long, 48h. La figure 50 représente le pourcentage de radioactivité injectée retrouvé dans le plasma de rats après injection de différentes formes d'apport du DHA.

Dans le plasma, des différences significatives ont été observées entre PC-DHA, AceDoPC et DHA non estérifiée 1h après injection mais pas 48h après injection.

1h après injection, la radioactivité retrouvée dans le plasma des rats PC-DHA est 27,5 +/- 3,8 % de la radioactivité initiale injectée avec une différence significative avec l'AceDoPC (7,07 +/- 0,6) et le DHA (4,04 +/- 2,49). 48h après injection, une diminution de ces pourcentages est remarquée pour les 3 formes d'apports avec un pourcentage voisin de 1% de la radioactivité initiale en ^{14}C .

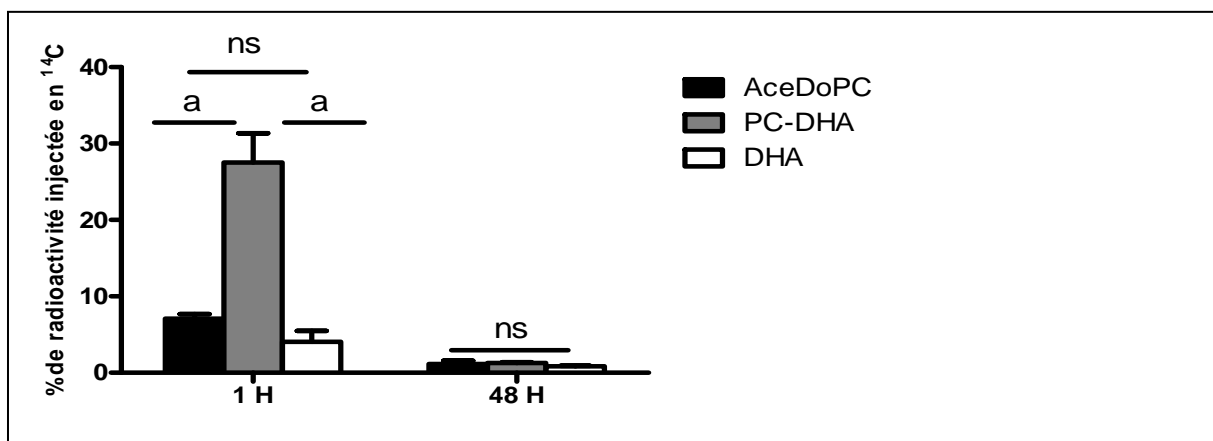


Figure 50: Comparaison de la radioactivité en ^{14}C retrouvée dans les lipides totaux du plasma chez des rats âgés de 20 jours après injection de $[^{14}\text{C}]$ -AceDoPC, $[^{14}\text{C}]$ -PC-DHA ou $[^{14}\text{C}]$ -DHA lié au plasma.

1mM (100 μl) de la solution marquée a été injecté dans la veine de la queue du rat, puis les rats ont été sacrifiés 1 heure et 48 heures après injection. Le plasma a été récupéré et les lipides totaux ont été extraits. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois valeurs, et ont été analysés en utilisant le logiciel Prism. Les données avec différentes lettres sont significativement différentes à $P < 0,05$ d'après l'analyse de variance (ANOVA), suivie par le test de Bonferroni.

I.4.2 Comparaison de l'incorporation du DHA apporté sous forme de DHA, AceDoPC ou PC-DHA dans les organes

Le pourcentage de radioactivité initiale retrouvé dans les lipides totaux des différents organes 1 heure et 48 heures après injection de [^{14}C]-DHA, [^{14}C]-AceDoPC ou de [^{14}C]-PC-DHA est représenté dans la figure 51.

Dans le cerveau (figure 51.a), le pourcentage de la radioactivité retrouvé dans les lipides totaux 1h après injection d'AceDoPC (0,78 +/- 0,13%) est plus élevé que celui observé après injection de PC-DHA (0,43 +/- 0,04%) alors que le DHA estérifié dans la PC est capté par le cerveau à un degré comparable à celui du DHA non estérifié (0,40 +/- 0,10 %). La préférence pour l'AceDoPC est encore observée 48 heures après injection, mais cette captation n'est plus significativement différente de celle de PC-DHA.

Au contraire, cette préférence pour l'AceDoPC 1h après injection n'est pas observée dans les autres organes étudiés. Dans le cœur (figure 51.b), 1h après injection, le pourcentage de radioactivité retrouvé après injection d'AceDoPC ou de PC est plus bas que celui, observé après injection de DHA non estérifié. Aucune préférence de captation n'est notée 48h post-injection quelque soit la forme d'apport.

Dans le foie (figure 51.c), une diminution du pourcentage de radioactivité est observée après injection de DHA non estérifié ou estérifié dans, l'AceDoPC ou la PC-DHA en fonction du temps. 48h post-injection, la PC-DHA est préférentiellement captée par le foie suggérant que le métabolisme de ce phospholipide est plus lent que celui du DHA non estérifié ou de l'AceDoPC.

Nos résultats montrent que seul le cerveau montre une préférence de captation du DHA estérifié sous forme d'AceDoPC comparativement à la PC-DHA et au DHA non estérifié.

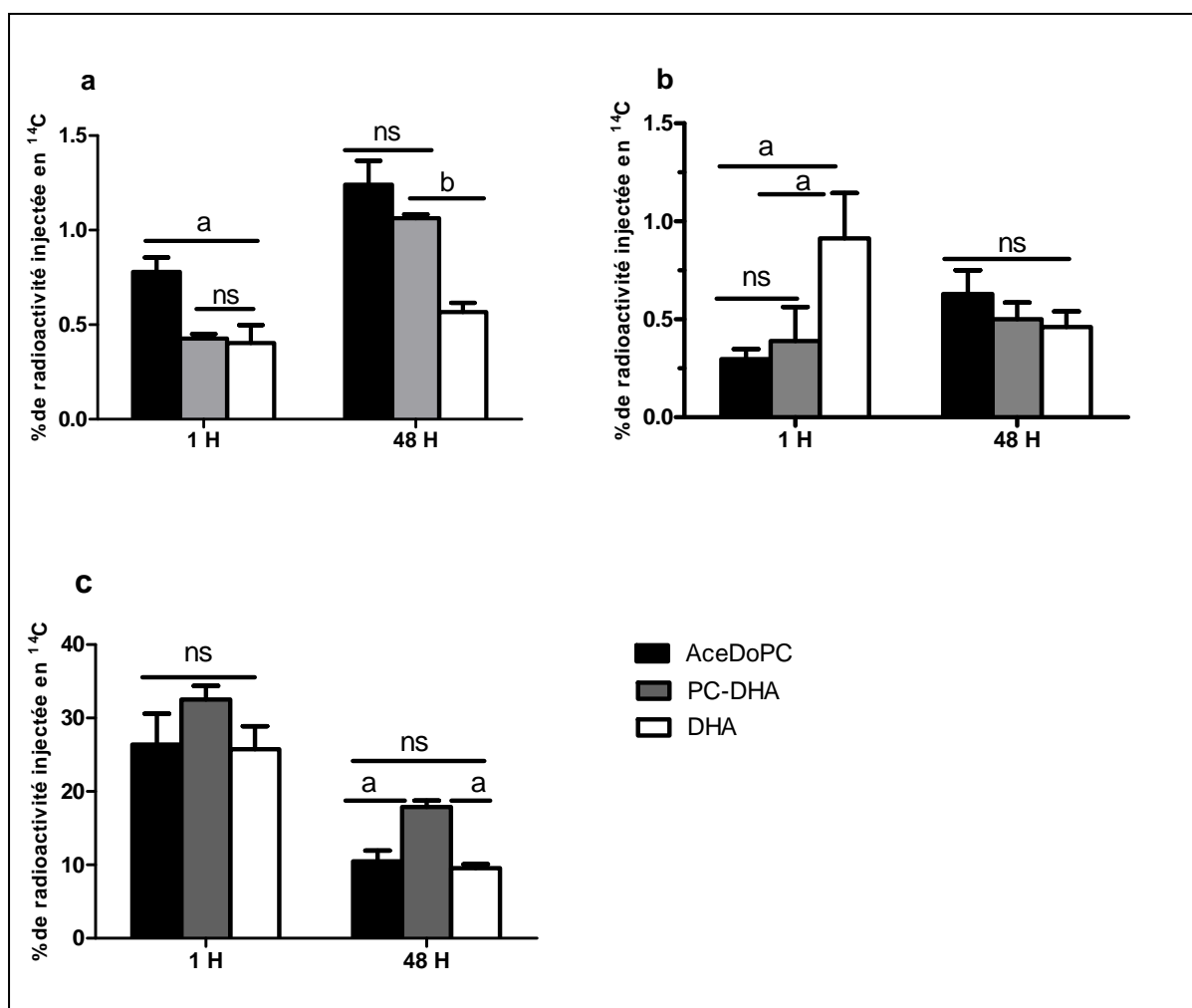


Figure 51: Comparaison de l'incorporation du DHA dans les lipides totaux des organes chez des rats âgés de 20 jours après injection de [^{14}C]-AceDoPC, [^{14}C]-PC-DHA ou [^{14}C]-DHA lié au plasma.

1mM (100 μl) de la solution marquée est injecté dans la veine de la queue du rat, puis les rats ont été sacrifiés 1 heure et 48 heures après injection. Les organes : (a) Le cerveau, (b) le cœur et le foie (c) ont été prélevés. Les lipides totaux sont extraits en utilisant la méthode de Bligh et Dyer. Les résultats représentent la moyenne \pm SD de trois valeurs, et ont été analysés en utilisant le logiciel Prism. Les données avec différentes lettres sont significativement différentes à $P < 0,05$ d'après l'analyse de variance (ANOVA), suivie par le test de Bonferroni.

I.5 Séparation de l'albumine et des lipoprotéines plasmatiques par chromatographie de gel filtration sur FPLC

Les lipides étant véhiculés dans le plasma par les lipoprotéines ainsi que par l'albumine, nous avons vérifié lequel de ces transporteurs était préférentiellement utilisé par l'AceDoPC, comparativement à la PC-DHA. L'étude de la distribution de l'AceDoPC et de la PC-DHA (1h après injection de [14 C]-AceDoPC ou de [14 C]-PC-DHA préalablement incubé dans du plasma humain) dans les différents transporteurs protéiques de lipides plasmatiques a été réalisée par FPLC comme décrit dans la partie matériels et méthodes I.3.2.3 Fast Protein Liquid Chromatography.

L'élution des échantillons a été suivie par détection de la densité optique (DO) à 280 nm. Des fractions de 0,3ml ont été alors collectées. Leurs contenus en triglycérides et cholestérol ainsi que l'albumine ont été dosés (dosage enzymatique et colorimétrique). Ceci permet d'établir un profil lipoprotéique (figure 52) et de déterminer la composition de chaque fraction. Une fois les différentes fractions de VLDL, LDL, HDL et albumine identifiées, les fractions correspondantes à chacune des classes ont été poolées et la radioactivité correspondante à chacune des fractions a été déterminée par comptage de la radioactivité.

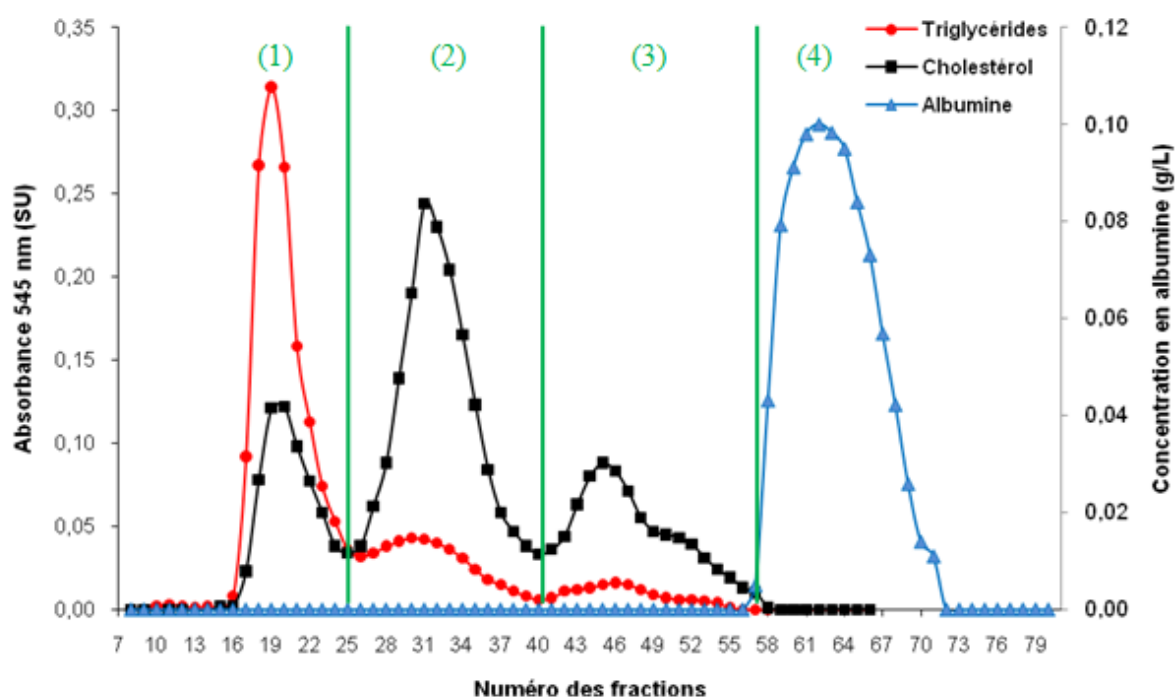


Figure 52: Répartition du cholestérol, des triglycérides et de l'albumine dans les différentes fractions récoltées par FPLC.

La courbe de l'absorbance à 545 nm correspond aux quantités de cholestérol (noir) ou de triglycérides (rouge) présentes dans les fractions. Ceci permet de déterminer dans quelles fractions se situent les VLDL (1), les LDL (2) et les HDL (3). Les fractions contenant l'albumine (4) sont déterminées grâce à la dernière courbe (bleu) correspondant à la concentration en albumine (g/L).

Le tableau 6 représente la distribution de la radioactivité dans les lipoprotéines et l'albumine plasmatique pour les 2 formes d'apport du DHA (AceDoPC et PC-DHA).

	VLDL	LDL	HDL	Albumine
[¹⁴C]-AceDoPC	9 %	12 %	44 %	35 %
[¹⁴C]-PC-DHA	16 %	16 %	41 %	27 %

Tableau 6: *Distribution de la radioactivité dans les lipoprotéines et l'albumine plasmatiques après injection de [¹⁴C]-AceDoPC ou de [¹⁴C]-PC-DHA (1mM) et sacrifice des rats 1h après l'injection.*

Le plasma a été préparé à partir de sang, préalablement transféré dans des tubes contenant de l'héparine comme anticoagulant, par centrifugation à 2600g pendant 10min. Les lipides totaux ont été extraits. Les différentes classes de lipoprotéines (VLDL, LDL et HDL) et l'albumine ont été séparées par FPLC. La radioactivité des différentes fractions a été déterminée par comptage à scintillation liquide. Les résultats représentent la moyenne de deux valeurs.

Nos résultats montrent que l'AceDoPC et la PC-DHA sont principalement liées aux lipoprotéines (respectivement 65% et 73%) ainsi qu'à l'albumine (35% pour l'AceDoPC et 27% pour la PC-DHA). Parmi les différentes classes de lipoprotéines, les HDL sont les plus marquées (44 % pour l'AceDoPC et 41 % pour la PC-DHA). L'AceDoPC est davantage liée à l'albumine que la PC.

I.6 Imagerie cérébrale *ex vivo* par autoradiographie cérébrale

Nous avons étudié la distribution cérébrale du DHA après injection intraveineuse d' [^{14}C]-AceDoPC chez le rat en utilisant la technique d'autoradiographie (figure 53).

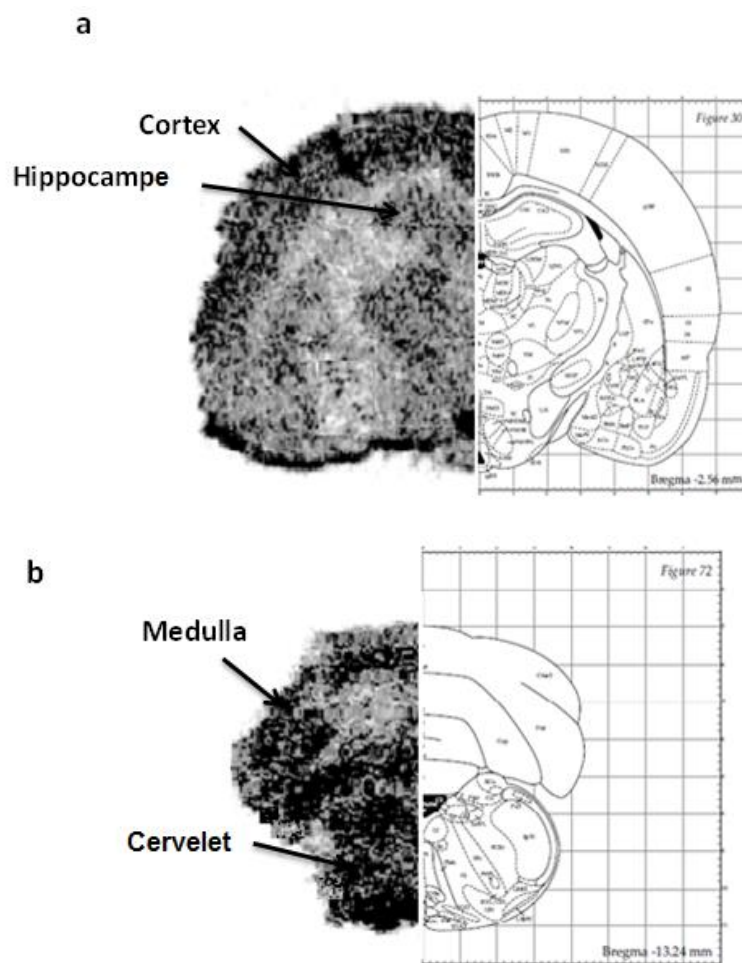


Figure 53: Autoradiographie cérébrale du [^{14}C]-DHA dans les différentes régions du cerveau de rat 48 heures après injection de [^{14}C]-AceDoPC.

(a) et (b) représentent des coupes à des niveaux différents de Bregma (-2,56 et -13,24 respectivement). La partie droite de chaque image représente une coupe caractéristique de cerveau. L' [^{14}C]-AceDoPC a été injecté dans la queue de rat, puis le rat a été sacrifié 48 heures après l'injection. Le cerveau a été rapidement prélevé, congelé dans l'azote liquide, et conservé à -80°C jusqu'à réalisation des coupes. Des coupes coronales de $40\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre ont été réalisées à l'aide d'un cryostat à -20°C puis placées sur une lamelle de verre. Les lames ont été apposées contre un film autoradiographique pendant 3 jours dans une cassette en présence de standards marqués au ^{14}C . Le film a été ensuite analysé au phosphor imageur. Les différentes régions cérébrales ont été identifiées en se référant à l'atlas stéréotaxique du cerveau de rat (Paxinos et Watson, 1998).

L'autoradiographie révèle que la radioactivité est localisée principalement dans le bulbe rachidien (medulla), le cervelet, le cortex cérébral, et l'hippocampe, suggérant une distribution spécifique.

I.7 Modélisation Moléculaire de l'AceDoPC et de la lysoPC-DHA

La figure 54 représente la modélisation moléculaire de l'AceDoPC et de la lysoPC-DHA (modélisation réalisée au laboratoire BF2I , INRA, INSA, Lyon).

Après minimisation de l'énergie et évaluation avec le logiciel SYBYL, un modèle de lysoPC-DHA et d'AceDoPC a été choisi et considéré comme représentatif de la structure 3D de ces phospholipides. La structure de l'AceDoPC et de la LysoPC-DHA apparaissent très proches avec un repliement global de l'AceDoPC similaire à celui de la lysoPC-DHA (figure 54.a et 54.b).

Nous avons également calculé les potentiels électrostatiques et lipophiles au niveau des surfaces moléculaires (surfaces de Connolly) de l'AceDoPC et de la lysoPC-DHA. Ces propriétés moléculaires peuvent être obtenues à partir des structures 3-D et pourraient être liées à la fonction des molécules. La distribution des potentiels hydrophobes, calculés par le programme MOLCAD (MOLEcular Computer Aided Design) du logiciel SYBYL, à la surface de l'AceDoPC et de la lysoPC-DHA est caractéristique d'une structure amphiphatique (figure 54.c et 54.d). On observe une face hydrophobe formée par le groupement docosahexaénoyle et une face hydrophile située à l'autre pôle de la molécule, comprenant le groupement glycérophosphocholine. Ce caractère amphiphile de l'AceDoPC et de la lysoPC-DHA peut favoriser leur interaction avec les membranes.

En ce qui concerne les propriétés électrostatiques de l'AceDoPC et de la lysoPC-DHA, étant donné la présence du groupement phosphate chargé négativement et la fonction choline chargée positivement, ces 2 molécules sont neutres, comme illustré par la représentation des potentiels électrostatiques à la surface des molécules (figure 54.e et 54.f). La face positive en rouge correspond au groupement choline, tandis que celle négative en bleu correspond au groupement phosphate.

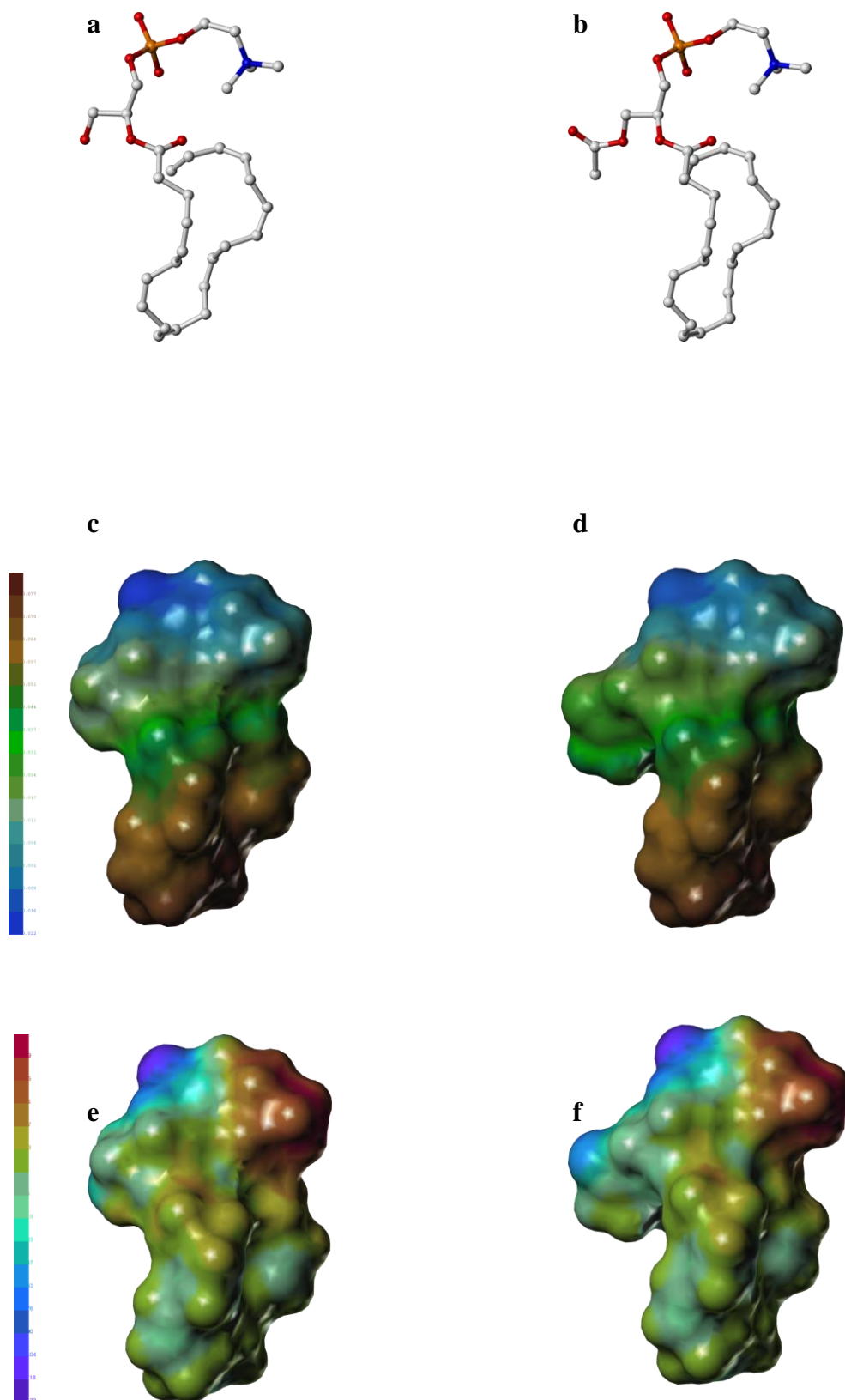


Figure 54: *Modélisation moléculaire de l’AceDoPC et de la lysoPC-DHA.*

(a) la structure 3-D de la lysoPC-DHA, (b) la structure 3-D de l'AceDoPC. Les potentiels lipophiles sont calculés avec le programme MOLCAD du logiciel SYBYL sur les surfaces moléculaires (surface de Connolly) de (c) la lysoPC-DHA, et de (d) l'AceDoPC dans la même orientation que dans les figures 54a et 54b, en utilisant une échelle hydrophobe commune. Les zones hydrophobe et hydrophile sont représentées en marron et bleu, respectivement. Les surfaces vertes représentent une hydrophobicité intermédiaire. Les potentiels électrostatiques sont calculés avec l'option MOLCAD de SYBYL sur les surfaces Connolly de (e) la lysoPC-DHA, et de (f) l'AceDoPC dans la même orientation que dans la figure 54a et 54b, en utilisant une échelle commune électrostatique. Les zones positives et négatives sont représentées en rouge et bleu, respectivement. Les surfaces couleur cyan représentent des zones neutres.

I.8 Discussion

Après avoir montré un passage préférentiel de la forme AceDoPC à travers le modèle *in vitro* de BHE, nous avons recherché si cette préférence pour l'AceDoPC était confirmée *in vivo* et avons donc étudié la biodisponibilité cérébrale du DHA apporté sous différentes formes chez le rat.

Dans un premier temps, nous avons injecté, par voie intraveineuse, dans la queue de rats mâles Wistar de 20 jours du [^{14}C]-DHA ou de l'[* ^{14}C]-AceDoPC (1mM, 0,5 μCi , préalablement lié au plasma). Après injection des différentes formes d'apport de DHA, nos résultats montrent une diminution de la radioactivité dans les lipides totaux plasmatiques en fonction du temps suggérant que le DHA marqué se distribue aux différents tissus. Une augmentation de la captation par le cerveau du DHA estérifié dans l'AceDoPC ou du DHA non estérifié est observée au cours du temps. Nous montrons une captation cérébrale préférentielle pour la forme AceDoPC comparativement au DHA non estérifié. La préférence pour l'AceDoPC est aussi observée comparativement au DHA estérifié dans une PC, en particulier aux temps courts. Cette captation préférentielle d'AceDoPC est spécifique au cerveau car elle n'est pas observée dans les autres organes étudiés (cœur, yeux, foie). Nos résultats confirment que l'AceDoPC, comme la lysoPC-DHA (Thiès et al., 1994), est préférentiellement captée par le cerveau de rat comparativement au DHA non estérifié.

Afin de savoir si le DHA est localisé dans des régions cérébrales spécifiques, nous avons réalisé l'imagerie du cerveau de rat par autoradiographie *ex vivo* 48 heures après injection d'AceDoPC marqué. Nous avons montré que la radioactivité est localisée principalement dans le bulbe rachidien, le cervelet, le cortex et l'hippocampe. Cette distribution présente un intérêt puisque le cortex cérébral et l'hippocampe sont importants dans des fonctions complexes dont la mémoire, la pensée et l'intelligence et le cervelet est également impliqué dans certaines fonctions cognitives telles que le langage et l'attention. Ceci est aussi en accord avec des études antérieures montrant que le DHA n'est pas réparti uniformément dans les régions cérébrales. Chez des rats de 21 jours, le cortex, le cervelet, l'hippocampe et le bulbe rachidien ont le taux de DHA le plus élevé dans le cerveau (Xiao et al., 2005). Sarda et al. (1991) ont montré que le [^{14}C]-DHA est incorporé préférentiellement dans la matière grise du cerveau, et au sein de celle-ci, dans les régions cérébrales principalement liées à la perception sensorielle, notamment le cortex cérébral.

Il est intéressant de souligner que l'AceDoPC est trouvée sous forme intacte dans le cerveau. Ceci suggère l'existence d'un système de reconnaissance de l'AceDoPC au niveau de la BHE pour son transfert au cerveau. Le papier récent de Nguyen et al. (2014) reporte le rôle important de Mfsd2a dans la captation du DHA. Mfsd2a est un transporteur de la BHE qui est constitutivement et exclusivement exprimé par les cellules endothéliales. Ces auteurs ont démontré, *in vitro* et *in vivo* chez des souris Mfsd2a $^{-/-}$, que Mfsd2a transporte le DHA à travers la BHE seulement lorsqu'il est apporté sous forme lysoPC (mais pas sous forme non estérifiée). En utilisant une approche de modélisation moléculaire, nos résultats indiquent une distribution des potentiels électrostatiques et lipophiles à la surface de l'AceDoPC et de la lysoPC-DHA très similaires, qui pourrait expliquer la reconnaissance similaire entre les deux molécules. Nous pouvons émettre l'hypothèse que Mfsd2a puisse transporter le DHA estérifié dans l'AceDoPC comme la lysoPC-DHA. Il est aussi intéressant de remarquer que l'AceDoPC est hydrolysée, en partie, en lysoPC-DHA dans le plasma (résultats non montrés), favorisant ainsi la captation cérébrale du DHA.

Dans le cerveau, les classes lipidiques les plus marquées sont l'AceDoPC, les PC et les PE. Nous avons observé une augmentation de l'incorporation du DHA dans les PC et les PE alors que le marquage dans la fraction AceDoPC diminue, ce qui indique une hydrolyse de l'AceDoPC en position *sn*-2 au cours du temps suivie par une ré-estérification du DHA dans les phospholipides (PC et PE). Une partie de la radioactivité liée aux PC et PE peut également provenir d'une captation des lysoPC-DHA plasmatiques qui seraient réacylées en PC, lesquelles seraient ensuite partiellement hydrolysées et le DHA ainsi libéré serait redistribué, notamment dans les PE, comme cela a été précédemment montré (Thiès et al., 1992 ; 1994). Alors que le marquage dans les PC est similaire entre 24 h et 48 h après injection, celui des PE continue d'augmenter. Ceci est en accord avec un processus de transacylation entre les PC et les PE. Les PC et les PE sont les deux classes lipidiques les plus marquées dans le foie et le cœur. Dans le cœur, un marquage important est aussi observé dans la fraction lipides neutres + AG libres après injection d'AceDoPC, ce qui pourrait supporter l'observation de l'importance du DHA non estérifié sur la physiopathologie du cœur (Xiao et al., 2005 ; Leaf et al., 1999 ; Mc Lennan et al., 1988 ; Swanson et al., 1989). La différence de la répartition des classes lipidiques entre le cerveau, le cœur et le foie peut s'expliquer par l'existence possible de voies métaboliques différentes pour l'AceDoPC. Le foie est connu par son rôle majeur dans la modification des acides gras et la synthèse des phospholipides non seulement pour ses propres membranes mais aussi pour l'exportation aux autres organes. Cette différence peut aussi s'expliquer par les propriétés spécifiques de la BHE dans la captation et le transfert de l'AceDoPC, ces propriétés étant différentes de celle de l'endothélium périphérique.

Après injection de DHA sous forme non estérifiée, le DHA est rapidement estérifié dans les PE et les PC dans tous les organes étudiés. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures (Weylandt et al., 1996 ; Onuma et al., 1984) qui ont montré que le DHA s'incorpore majoritairement dans les PC et les PE du cerveau de rat alors que l'incorporation de l'acide arachidonique suit l'ordre PC>PI>PE.

Finalement, nous avons étudié la liaison du DHA apporté sous forme de PC-DHA ou d'AceDoPC aux différentes protéines plasmatiques (lipoprotéines et albumine). Nous avons montré que la PC-DHA ainsi que l'AceDoPC sont liées principalement aux HDL et peu aux autres classes lipoprotéiques (VLDL et LDL). Il est intéressant de rappeler que Chen et al. (2008) ont montré que les récepteurs aux LDL présents à la surface des cellules endothéliales des capillaires cérébraux ne sont pas nécessaires à l'apport des AGPI dans le cerveau. D'autres auteurs ont suggéré que l'absence de récepteur des VLDL ne modifie pas la composition en DHA dans le cerveau (Rahman et al., 2010) et qu'un mécanisme de transport différent de celui des VLDL doit exister pour transporter les AGPI au cerveau. Par contre, les récepteurs des HDL ont été identifiés sur la surface des capillaires cérébraux (Srivastava, 2003). Nos résultats montrent aussi que l'AceDoPC est liée à l'albumine comme cela avait été précédemment montré pour la lysoPC (Croset et al., 2000).

En conclusion, notre étude montre que l'AceDoPC est un transporteur privilégié et spécifique de DHA au cerveau, par rapport à d'autres formes d'apport de DHA (DHA non estérifié et estérifié dans une PC). En considérant les rôles essentiels du DHA dans la croissance et les fonctions cérébrales, cette nouvelle approche de ciblage cérébral avec du DHA offre des perspectives prometteuses dans le développement de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques pour les maladies neurologiques.

Le travail rapporté dans ce chapitre et dans le chapitre précédent a donné lieu à la rédaction d'un article soumis dans *Molecular Neurobiology*.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les maladies neurodégénératives et neuropsychiatriques comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la schizophrénie sont accompagnées d'une diminution des concentrations en DHA dans le cerveau des patients. Des recherches récentes soulignent l'importance du DHA dans la prévention et le traitement de ces maladies. Les connaissances actuelles des mécanismes responsables de l'accumulation sélective d'acides gras polyinsaturés dans le cerveau sont partielles. Le DHA peut être synthétisé *in situ* à partir de son précurseur, l'ALA, ou capté préformé à partir de la circulation. Cette synthèse *in situ* du DHA est limitée chez l'Homme. Un apport exogène en DHA est donc nécessaire notamment chez les patients ayant des troubles neurologiques. Le ciblage spécifique du DHA au cerveau offre donc des perspectives prometteuses dans le développement de nouvelles thérapies contre les maladies cérébrales.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la vectorisation du DHA au cerveau sous différentes formes : non estérifiée ou estérifiée dans des phospholipides. Dans un premier temps, nous avons synthétisé un phospholipide structuré nommé AceDoPC qui possède un groupement acétyle en position *sn-1* et du DHA en position *sn-2*. L'AceDoPC est considérée comme étant la forme stabilisée de la 1-lyso,2-DHA,PC, une forme privilégiée de passage du DHA au cerveau *in vivo* et *in vitro* (Thiès et al., 1994 ; Bernoud et al., 1999). La molécule d'AceDoPC est marquée au ^{14}C -DHA afin de suivre le métabolisme et la distribution de la molécule dans les modèles utilisés. Cette forme d'apport a été comparée à celle du DHA non estérifié ou du DHA estérifié en position *sn-2* d'une PC (forme d'apport naturelle du DHA que nous trouvons dans l'alimentation). La PC-DHA marquée au ^{14}C -DHA n'étant pas commercialisée, nous l'avons synthétisée. Nous avons étudié la biodisponibilité cérébrale du DHA apporté sous ces différentes formes : 1) Sur un modèle *in vitro* de BHE et 2) Sur un modèle *in vivo* de rat normal, sans atteinte cognitive. Une étude clinique chez l'Homme est également en cours. La figure 55 résume l'ensemble des études réalisées.

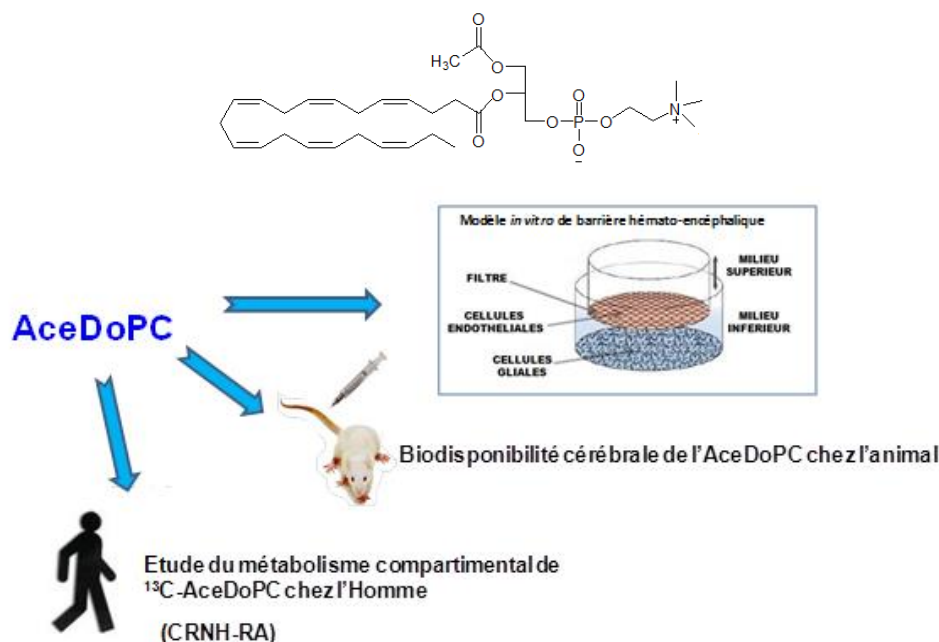


Figure 55: Récapitulatif des études.

Nos résultats ont révélé une spécificité du cerveau dans la captation préférentielle de l'AceDoPC par rapport aux autres formes d'apports puisque cette préférence pour l'AceDoPC n'est pas retrouvée dans les autres organes. Les résultats de nos études concernant le passage du DHA non estérifié et sous forme estérifiée dans AceDoPC ou PC à travers la BHE reconstituée *in vitro* confirment bien la validité de ce modèle de co-culture. En effet, nous avons retrouvé *in vitro* aussi bien que *in vivo* un passage cérébral préférentiel du DHA sous forme estérifiée dans AceDoPC comparativement aux autres formes d'apport. Nos résultats sont donc en faveur d'une accréation cérébrale de DHA privilégiée quand il est sous forme d'AceDoPC. L'avantage de l'AceDoPC sur la lysoPC-DHA est de maintenir le DHA dans la position *sn*-2 qui est la position physiologique, pour tous les acides gras polyinsaturés, dans les tissus.

De nombreuses perspectives de recherche peuvent être envisagées suite à ce travail. L'étude des mécanismes de passage de l'AceDoPC à travers la monocouche endothéliale elle-même et de l'intervention d'éventuels récepteurs spécifiques (comme le récepteur Mfsd2a) pourrait être envisagée. Le rôle respectif des différentes cellules impliquées dans le métabolisme et le transport de l'AceDoPC pourrait être aussi précisé en utilisant le modèle *in vitro* de la BHE. Ceci pourrait être réalisé en modifiant différents paramètres du protocole utilisé :

- afin d'analyser si des substances libérées dans le milieu inférieur durant la période de pré-incubation pourraient être responsables de la préférence observée pour l'AceDoPC, le milieu inférieur de pré-incubation pourrait être remplacé par du DMEM « frais » avant de débiter l'incubation des substrats marqués.

- pour tester si le passage préférentiel de l'AceDoPC à travers la monocouche endothéliale nécessite la présence ou non de molécules éventuellement sécrétées par les cellules gliales, l'étude pourrait être réalisée avec des cellules endothéliales cultivées seules. Une caractérisation de la nature de transporteurs éventuels dans le milieu situé entre les cellules endothéliales et les cellules gliales qui pourraient posséder une affinité particulière pour l'AceDoPC pourrait être aussi envisagée.

Des études supplémentaires sont aussi nécessaires pour mieux comprendre la formation de lysoPC-DHA dans les milieux après incubation des cellules endothéliales avec de l'AceDoPC.

Dans le cadre de l'étude *in vivo* de captation cérébrale de DHA, la captation préférentielle du DHA estérifié sous forme d'AceDoPC ouvre plusieurs perspectives. Différents modes d'administration des substrats marqués peuvent être envisageables comme les injections intracérébrales ou les administrations par voie orale étant donné que la technique d'injection utilisée influence le métabolisme cérébral des acides gras. Il serait pertinent d'étudier les effets de l'AceDoPC sur des rats atteints des maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer en comparaison avec des rats contrôles. L'étude de la captation cérébrale du DHA apporté sous forme d'AceDoPC pourrait être envisagée chez des rats jeunes et chez des rats âgés et de sexes différents afin d'étudier la variation ou pas du métabolisme du DHA en fonction de l'âge et du sexe.

Chez l'Homme, l'étude de la biodisponibilité du DHA marqué au ¹³C ingéré sous trois formes lipidiques (TG-DHA, PC-DHA ou AceDoPC) est en cours afin de voir s'il existe une différence d'incorporation du DHA au niveau des membranes des globules rouges (index d'accréation cérébrale du DHA) en fonction de la forme d'apport. Cette étude est une recherche biomédicale en double aveugle, randomisée, en cross-over (3 séquences) pour une

durée de 18 mois et réalisée chez 4 sujets sains de sexe masculin ayant un âge compris entre 60 et 70 ans sans atteinte cognitive.

Enfin, dans l'étude du transport de l'AceDoPC au cerveau, il est important d'étudier sa biodisponibilité intestinale. En effet l'intestin constitue, pour les molécules lipidiques, dans le cas d'une administration per os, la première barrière à franchir. Nous avons débuté cette étude en utilisant un modèle *in vitro* de barrière intestinale. Ce modèle est formé d'une culture de cellules entérocytaires Caco-2/TC7. Nous avons incubé les cellules pendant différents temps avec de l'AceDoPC marqué et avons observé une augmentation du pourcentage de radioactivité dans le milieu inférieur de la culture en fonction du temps d'incubation. Cette étude sera approfondie, notamment en analysant la distribution de la radioactivité dans les différentes classes lipidiques pour confirmer ainsi le passage de la molécule d'AceDoPC à travers la barrière entérocytaire, sous forme entière ou hydrolysée. Une étude *in vivo* est également en cours où la biodisponibilité intestinale de l'AceDoPC est étudiée selon une approche de dérivation lymphatique chez le rongeur, en collaboration avec l'ITERG (Institut des Corps Gras, expert dans le domaine de la biodisponibilité et du devenir métabolique des lipides). Ainsi nous serons en mesure, suite à l'étape de digestion gastro-intestinale, de déterminer i) quel est le taux de passage de l'AceDoPC, et notamment après sa métabolisation au niveau entérocytaire ii) quel est son devenir métabolique au sein des différentes fractions lipidiques de la lymphe. Ces données permettront ainsi de définir la biodisponibilité intestinale de l'AceDoPC et quelle(s) est (sont) sa (ses) forme(s) de présentation dans l'organisme suite à sa digestion et son passage entérocytaire.

ANNEXE

Biodisponibilité chez l'Homme du DHA apporté sous forme de triacylglycérol (TG-DHA), phosphatidylcholine (PC-DHA) et AceDoPC

I.1 Introduction et objectifs de l'étude

Une étude du métabolisme compartimental de l'AceDoPC marqué au carbone 13 (au niveau du DHA) chez l'Homme a démarré en avril 2014 pour une durée de 18 mois. Cette étude est réalisée en collaboration avec le Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes (CRNH).

Dans le cadre du programme ANR « Neuroprotect » (2008-2011), l'étude pilote a été réalisée pour juger de la faisabilité du projet et de la possibilité de détecter le ^{13}C -DHA directement dans le cerveau par imagerie de résonance magnétique nucléaire (IRM) du carbone 13 (voir Rappels bibliographiques, chapitre IV, partie I.3).

L'objectif principal de cette étude est de comparer l'incorporation de DHA marqué au carbone 13 dans la membrane des globules rouges en fonction du temps et selon la forme d'ingestion (TG-DHA *versus* PC-DHA *versus* AceDoPC), l'accrétion du DHA dans les globules rouges étant considérée comme un index de l'accrétion au cerveau (Fleith et Clandinin, 2005).

Les objectifs secondaires sont d'étudier l'incorporation de DHA marqué au carbone 13 dans les plaquettes et les lipides plasmatiques.

Cette étude étant en cours, seul sera décrit le protocole expérimental réalisé.

I.2 Protocole expérimental

Cette étude clinique est une recherche biomédicale en double aveugle, randomisée, en cross over (3 séquences).

L'étude est réalisée chez 4 sujets sains de sexe masculin ayant un âge compris entre 60 et 70 ans sans atteinte cognitive, un indice de masse corporelle entre 20 et 30kg/m², une glycémie à jeun inférieur à 7mmol/L, un cholestérol total inférieur ou égal à 7mmol/L, un taux de triglycérides inférieur à 1,7mmol/L et d'hémoglobine supérieur à 13g/dl.

Pour chaque volontaire, il y a 13 visites dont :

- 1 visite de sélection (V0)
- 3 journées d'exploration (V1, V5 et V9) : journées pendant lesquelles un des 3 produits (50mg équivalent DHA) est ingéré par le volontaire. Ces journées d'explorations sont séparées de 120 jours de wash out.

Les visites V2, V3, V4, V6, V7, V8, V10, V11 et V12 sont consacrées au prélèvement du sang (36ml/prélèvement). Le volume sanguin prélevé réparti sur les mois correspond à 1/3 d'un don du sang par séquence (6 jours), soit l'équivalent d'environ 2 dons de sang au total pendant l'étude. Une cinétique de prélèvements sanguins (T0, T1(1h), T3(3h) et T6(6h) heures puis J1(24h), J3(3jours) et J6(6jours)) est effectuée. Le même protocole est appliqué à 4 mois puis 8 mois.

Auparavant un test de toxicité anormale effectué chez la souris par le centre de recherche biologique et validé par la pharmacie de l'hôpital a montré qu'il n'y avait aucun risque pour l'ingestion des trois formes de DHA.

I.2.1 Synthèse de l' ^{13}C -AceDoPC

La synthèse de l'AceDoPC marquée au carbone 13 se fait dans les mêmes conditions que la synthèse de l'AceDoPC marquée au carbone 14 (voir matériels et méthodes, I.1.1. Synthèse de 1-acétyl,2- ^{14}C docosaheptaénoyl-glycérophosphocholine ou ^{14}C -AceDoPC).

Nous réalisons d'abord une hydrolyse basique par LiOH de l'ester de DHA : U ^{13}C -docosaheptaénoic acid methyl ester (qui nous a été gracieusement donné par le Dr Anthony Windust). Le DHA obtenu étant marqué au carbone 13 uniformément, il sera utilisé pour la synthèse de l' ^{13}C -AceDoPC.

La synthèse de l'AceDoPC est réalisée suivant le schéma représenté dans la figure 56. La glycérophosphocholine (1) commerciale est acétylée enzymatiquement *par Candida antarctica* en présence d'acétate de vinyle. La 1-acétyl-glycérophosphocholine (2) est purifiée par précipitation à l'éther puis acylée chimiquement par le ^{13}C -DHA. La pureté de l' ^{13}C -AceDoPC est vérifiée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et par résonance magnétique nucléaire (RMN). La présence du DHA est analysée en chromatographie gazeuse (GC) et l'enrichissement est mesuré en ^{13}C en GC/MS.

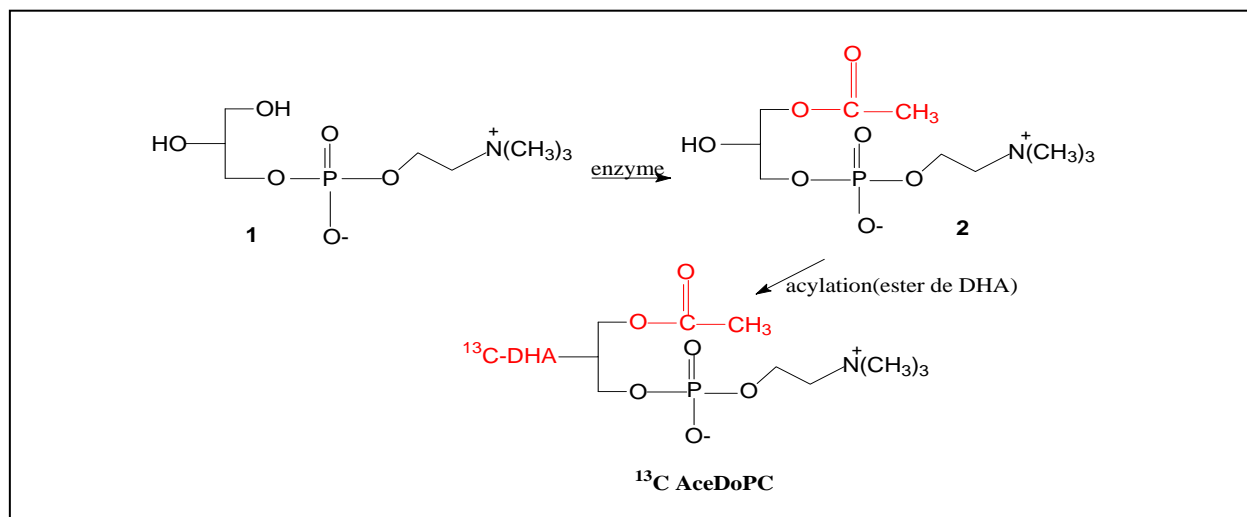


Figure 56: Schéma de synthèse de l'AceDoPC marquée au ^{13}C .

I.2.2 Productions et analyses structurales de triglycérides (TG) et phosphatidylcholines (PC) à ^{13}C -DHA

Le schéma général de production des TG et des PC à ^{13}C -DHA est représenté sur la figure 57.

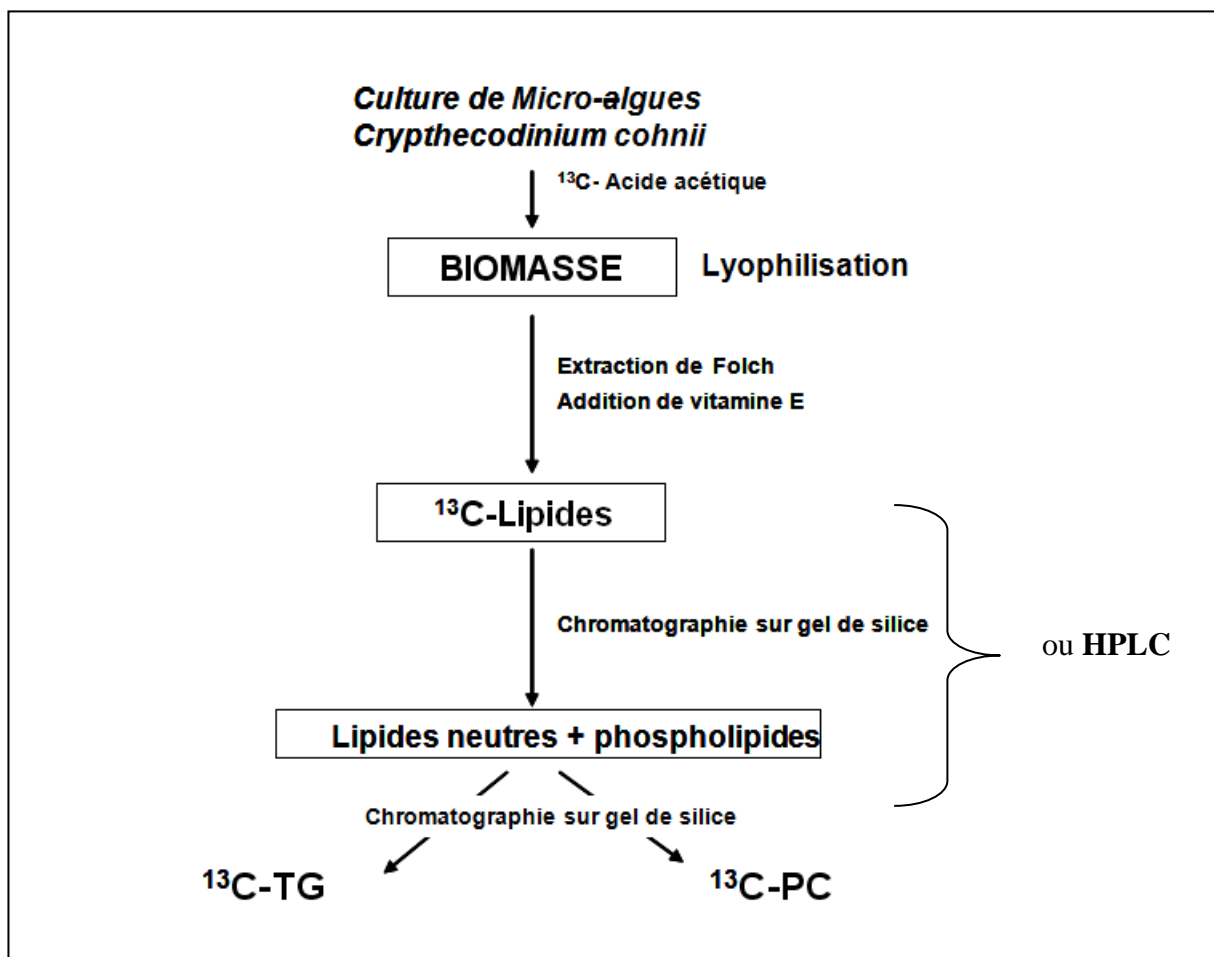


Figure 57: Production des TG et PC marqués au ^{13}C .

I.2.2.1 Culture de microalgues

La culture des microalgues *Cryptocodinium cohnii* a été réalisée à plus grande échelle à Tours par Nestlé suivant notre protocole et a fourni la biomasse. Les microalgues proviennent de chez ATCC (American Type Culture Collection), la souche est ATCC-30772. Les produits utilisés pour le milieu de culture sont de qualité culture de cellules ou d'insectes et proviennent de Sigma ou de Riedel-deHaën. Les algues hétérotrophes ont été cultivées pendant plusieurs jours dans un milieu composé de sels et d'eau et à l'obscurité. Le milieu de démarrage de la culture contient du glucose, qui sert de source carbonique ensuite il est remplacé par l'acide acétique marqué au ^{13}C .

Pendant la culture des cellules, différents paramètres ont été mesurés:

- la densité optique: l'absorbance mesurée étant proportionnelle à la croissance cellulaire (selon la loi de Beer- Lambert).
- le glucose : dosé à l'aide d'un glucomètre, déduction de sa consommation par les microalgues.
- la biomasse.

Tous les jours, le pH et la température ont été contrôlés. Le pH optimal étant de 6,5 et la température optimale de 27°C. Après 20 jours de culture, la biomasse a été récupérée.

I.2.2.2 Obtention des ^{13}C -TG-DHA et ^{13}C -PC-DHA

Les lipides sont extraits à partir de la biomasse. Après avoir obtenu l'extrait lipidique, les différentes classes de lipides sont séparées par HPLC préparative sur une colonne (21 x 250 mm) de silice (phase normale) de granulométrie 10 μm avec un gradient d'élution composé de solvant A (hexane/2-propanol : 55/44) et de solvant B (hexane/2-propanol/eau : 60/120/20) avec un débit constant de 30mL/min.

Dans le tableau 7, ci-dessous, sont consignées les conditions de gradient et les solvants utilisés.

	Hexane – Isopropanol – H ₂ O	Temps
Solvant A	55 / 44 / 0	0 à 5 min
Solvant B	60 / 120 / 20	60 à 75 min
Solvant A	55 / 44 / 0	75 à 90 min

Tableau 7: Gradient d'élution utilisé en HPLC préparative pour la séparation des différentes classes de lipides.

D'après le chromatogramme ci-dessous (figure 58), les lipides neutres non séparés sont élués avec le front du solvant (0 à 8 minutes) tandis que les phospholipides sont bien séparés (PC (70 à 95 minutes) et PE (25 à 40 minutes)).

A chaque injection, la fraction des lipides neutres et la fraction des PC sont récupérées. La forme du pic de PC montre qu'il y a plusieurs espèces moléculaires de PC.

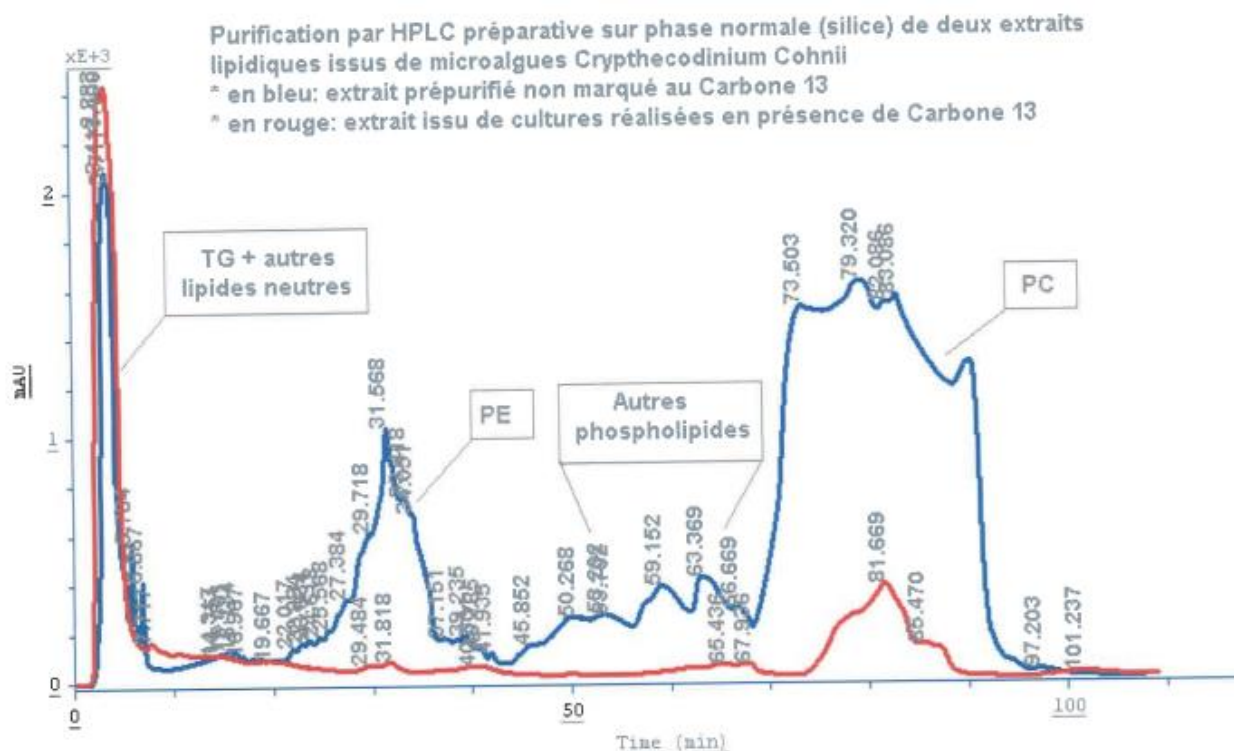


Figure 58: Purification par HPLC préparative sur phase normale des extraits lipidiques issus de microalgues.

Les fractions récupérées de TG et PC sont débarrassées de tous les solvants et lyophilisées afin d'éliminer toutes traces d'eau.

La qualité des composés synthétisés a été vérifiée par HPLC analytique, par RMN du proton, du carbone, et par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

I.2.2.3 Analyse structurale des ^{13}C -TG-DHA et ^{13}C -PC-DHA par chromatographie en phase gazeuse (GC)

Analyse des ^{13}C -PC

Selon l'analyse GC, les PC renferment 14% de C14:0, 43% de C16:0, 5% de C18:0, 5% de C18:1n-9 et 25% de C22:6n-3.

Analyse des ^{13}C -TG

Selon l'analyse GC, les TG renferment environ 42% de C14:0, 31% de C16:0, 1% de C18:0, 1% de C18:1n-9 et 20% de C22:6n-3.

Compte tenu des pourcentages, on a environ $\frac{3}{4}$ d'acides gras saturés et $\frac{1}{4}$ d'acides gras insaturés.

I.2.2.4 Analyse des ^{13}C -TG-DHA et ^{13}C -PC-DHA par résonance magnétique nucléaire

L'analyse RMN des ^{13}C -TG et ^{13}C -PC a été réalisée par les expériences du Proton et du ^{13}C sur un spectromètre RMN Bruker 400MHz.

Environ 10mg de chaque échantillon ont été solubilisés dans 0,75ml de chloroforme deutérié (CDCl_3).

L'analyse des spectres proton et carbone 13 a conduit non pas à une simple identification structurale moléculaire mais à l'identification d'une famille compte tenu de la diversité des combinaisons d'acides gras présents sur la chaîne glycérol comme nous l'avons vu par GC.

L'analyse des spectres proton et carbone a montré que l'échantillon de ^{13}C -PC ainsi que celui du ^{13}C -TG obtenus étaient très purs (résultats non montrés).

I.2.3 Séparation des différents constituants sanguins à partir du sang

Après ingestion d'une des molécules marquées au ^{13}C , 36ml de sang sont prélevés dans des tubes ACD aux intervalles de temps : T0, T1, T3, T6, J1, J3 et J6.

Les différents constituants du sang (globules rouges, plasma, plaquettes) sont séparés selon le protocole décrit dans la figure 59, puis conservés, après addition de BHT, sous azote à -80°C jusqu'à analyse des lipides.

Les tampons utilisés dans les séparations des différents constituants sanguins ont les compositions suivantes :

- Tyrode HEPES : 140mM NaCl, 2,7mM KCl, 12mM NaHCO_3 , 0,41mM NaH_2PO_4 , 1mM MgCl_2 , 5mM HEPES, 5,5mM glucose, pH 7,35.
- Tyrode HEPES/EDTA : 140mM NaCl, 2,7mM KCl, 12mM NaHCO_3 , 0,41mM NaH_2PO_4 , 1mM MgCl_2 , 5mM HEPES, 5,5mM glucose, 1mM EDTA, pH 6,4.

I.2.4 Analyse des différents constituants sanguins

Les constituants sanguins (plasma pauvre en plaquettes, globules rouges, plaquettes) sont analysés afin de pouvoir mesurer l'enrichissement isotopique par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse isotopique.

La figure 60 représente un récapitulatif de l'analyse des constituants sanguins.

Dans un premier temps, les lipides totaux de ces constituants sont extraits selon la méthode de Bligh et Dyer (1959) en présence d'étalons internes et les différentes classes de lipides sont ensuite séparées par CCM.

Les classes lipidiques isolées dans les constituants sanguins sont :

- Phospholipides et esters de cholestérol dans le plasma.
- Phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamines dans les plaquettes.
- Phosphatidylcholines, phosphatidyléthanolamines, Lysophosphatidylcholines et AceDoPC dans les globules rouges.

Une transméthylation des acides gras constitutifs de chaque classe lipidique est réalisée selon la méthode de Morrison et Smith (1964).

La chromatographie en phase gazeuse permet de déterminer le profil de composition en acide gras avec quantification du DHA. Le DHA méthylé est ensuite séparé des autres AG méthylés et récolté par HPLC semi-préparative (colonne silice C18).

La dernière étape de l'analyse est la mesure de l'enrichissement isotopique du ^{13}C -DHA par spectrométrie de masse isotopique couplée à la chromatographie en phase gazeuse qui est réalisée au CRNH.

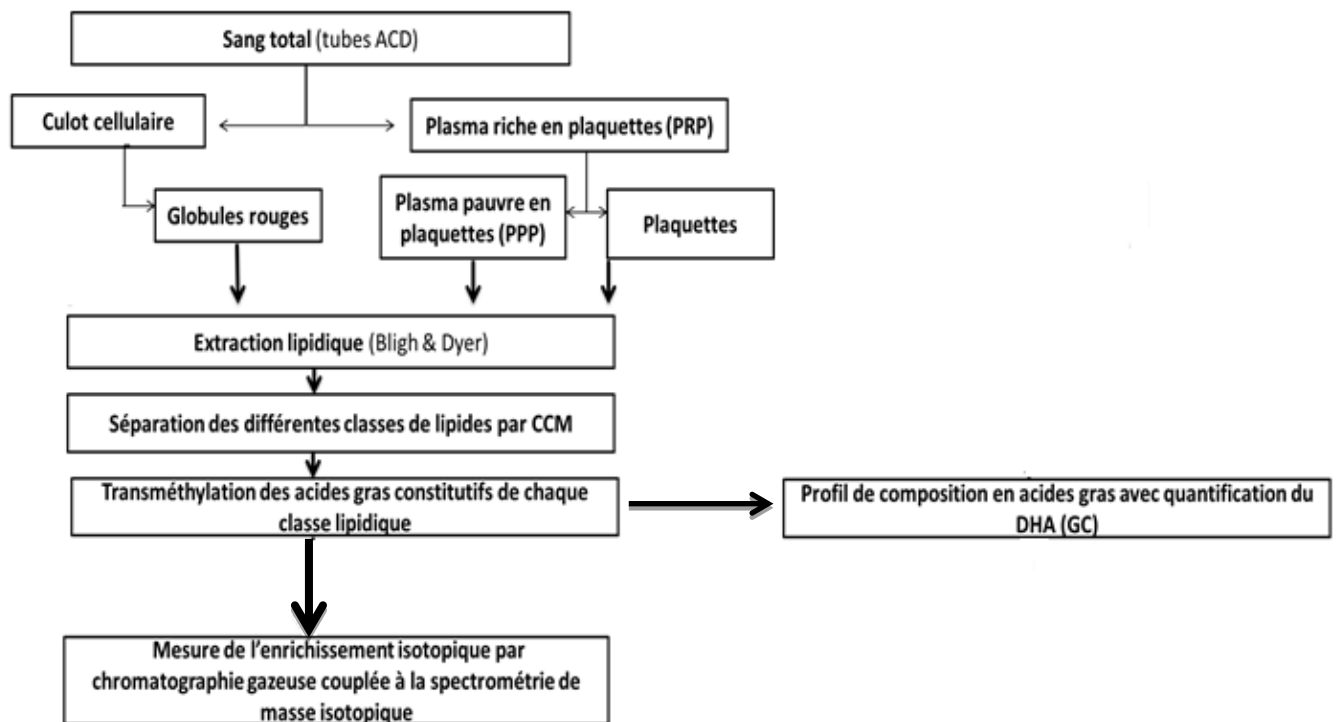


Figure 60: Récapitulatif de l'analyse des constituants sanguins.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37, 13-25.

Abbott, N.J., Ronnback, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41-53.

AFSSA., 2010. Avis de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. [<https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/NUT2006sa0359.pdf>].

Aiyar, N., Disa, J., Ao, Z., Ju, H., Nerurkar, S., Willette, R.N., Macphee, C.H., Johns, D.G., Douglas, S.A., 2007. Lysophosphatidylcholine induces inflammatory activation of human coronary artery smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* 295, 113-120.

Alessandri, J.M., Guesnet, P., Vancassel, S., Astorg, P., Denis, I., Langelier, B., Aid, S., Poumes-Ballihaut, C., Champeil-Potokar, G., Lavialle, M., 2004. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev* 44, 509-538.

Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S., Richmond, W., Fu, P.C., 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20, 470-475.

Anderson, G.J., Connor, W.E., 1988. Uptake of fatty acids by the developing rat brain. *Lipids* 23, 286-290.

Anderson, R.E., Maude, M.B., Alvarez, R.A., Acland, G.M., Aguirre, G.D., 1991. Plasma lipid abnormalities in the miniature poodle with progressive rod-cone degeneration. *Exp Eye Res* 52(3), 349-355.

Anderson, G.J., Tso, P.S., Connor, W.E., 1994. Incorporation of chylomicron fatty acids into the developing rat brain. *J Clin Invest* 93(6), 2764-2767.

Astarita, G., Jung, K.M., Berchtold, N.C., Nguyen, V.Q., Gillen, D.L., Head, E., Cotman, C.W., Piomelli, D., 2010. Deficient liver biosynthesis of docosahexaenoic acid correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease. *PLoS One* 5, e12538.

Azema, C., Marques-Vidal, P., Lespine, A., Simard, G., Chap, H., Perret, B., 1990. Kinetic evidence for phosphatidylethanolamine and triacylglycerol as preferential substrates for hepatic lipase in HDL subfractions: modulation by changes in the particle surface, or in the lipid core. *Biochim Biophys Acta* 1046, 73-80.

Baker, R.R., Chang, H.Y., 1981. A comparison of lysophosphatidylcholine acyltransferase activities in neuronal nuclei and microsomes isolated from immature rabbit cerebral cortex. *Biochim Biophys Acta* 666, 223-229.

Balestrieri, B., Arm, J.P., 2006. Group V sPLA2: classical and novel functions. *Biochim Biophys Acta* 1761, 1280-1288.

Balsinde, J., Balboa, M.A., 2005. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cell Signal* 17, 1052-1062.

Balsinde, J., Perez, R., Balboa, M.A., 2006. Calcium-independent phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1761, 1344-1350.

Bazan, N.G., 2003. Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. *J Lipid Res* 44, 2221-2233.

Bazan, N.G., 2006. The onset of brain injury and neurodegeneration triggers the synthesis of docosanoid neuroprotective signaling. *Cell Mol Neurobiol* 26(4-6), 901-913

Bazan, N.G., Scott, B.L., 1990. Dietary omega-3 fatty acids and accumulation of docosahexaenoic acid in rod photoreceptor cells of the retina and at synapses. *Ups J Med Sci Suppl* 48, 97-107.

Bazan, N.G., Molina, M.F., Gordon, W.C., 2011. Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annu Rev Nutr* 31, 321-351.

Bazinet, R.P., Layé, S., 2014. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* 15(12), 771-785.

Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O.M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S., Dejana, E., 2000. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* 275, 20520-20526.

Begley, D.J., 2004. ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des* 10, 1295-1312.

Belayev, L., Marcheselli, V.L., Khoutorova, L., Rodriguez de Turco, E.B., Busto, R., Ginsberg, M.D., Bazan, N.G., 2005. Docosahexaenoic acid complexed to albumin elicits high-grade ischemic neuroprotection. *Stroke* 36, 118-123.

Belayev, L., Khoutorova, L., Atkins, K.D., Bazan, N.G., 2009. Robust docosahexaenoic acid-mediated neuroprotection in a rat model of transient, focal cerebral ischemia. *Stroke* 40, 3121-3126.

Belkind-Gerson, J., Carreón-Rodríguez, A., Contreras-Ochoa, C.O., Estrada-Mondaca, S., Parra-Cabrera, M.S., 2008. Fatty acids and neurodevelopment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 47, Suppl 1:S7-9.

Benistant, C., Dehouck, M.P., Fruchart, J.C., Cecchelli, R., Lagarde, M., 1995. Fatty acid composition of brain capillary endothelial cells: effect of the coculture with astrocytes. *J Lipid Res* 36, 2311-2319.

Berezowski, V., Landry, C., Dehouck, M.P., Cecchelli, R., Fenart, L., 2004. Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res* 1018, 1-9.

Bergström, S., 1982- SUNE - (1916-2004) », Encyclopædia Universalis [en ligne], consulté le 24 décembre 2014. URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/sune-bergstrom/>

Bernoud, N., Fenart, L., Benistant, C., Pageaux, J.F., Dehouck, M.P., Moliere, P., Lagarde, M., Cecchelli, R., Lecerf, J., 1998. Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells in vitro. *J Lipid Res* 39, 1816-1824.

Bernoud, N., Fenart, L., Moliere, P., Dehouck, M.P., Lagarde, M., Cecchelli, R., Lecerf, J., 1999. Preferential transfer of 2-docosa-hexaenoyl-1-lysophosphatidylcholine through an in vitro blood-brain barrier over unesterified docosa-hexaenoic acid. *J Neurochem* 72, 338-345.

Bernoud-Hubac, N., Davies, S.S., Boutaud, O., Montine, T.J., Roberts, L.J 2nd., 2001. Formation of highly reactive gamma-ketoaldehydes (neuroketals) as products of the neuroprostan pathway. *J Biol Chem* 276(33), 30964-30970.

Betsholtz, C., 2014. Physiology: Double function at the blood-brain barrier. *Nature* 509, 432-433.

Birch, E.E., Garfield, S., Hoffman, D.R., Uauy, R., Birch, D.G., 2000. A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Dev Med Child Neurol* 42, 174-181.

Bishop, W.R., Bell, R.M., 1988. Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu Rev Cell Biol* 4, 579-610.

Black, K.L., Baba, T., Pardridge, W.M., 1994. Enzymatic barrier protects brain capillaries from leukotriene C4. *J Neurosurg* 81, 745-751.

Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.

Bloch, K., Lynen, F., 1964. "The Nobel Prize in Physiology or Medicine. Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 23 Dec 2014. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1964/>

Bonen, A., Chabowski, A., Luiken, J.J., Glatz, J.F., 2007. Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. *Physiology (Bethesda)* 22, 15-29.

Booher, J., Sensenbrenner, M., 1972. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* 2, 97-105.

Bornstein, M.B., 1958. Reconstituted rattail collagen used as substrate for tissue cultures on coverslips in Maximow slides and roller tubes. *Lab Invest* 7, 134-137.

Bourre, J.M., Dumont, O., Clément, M., Durand, G., 1995. Les acides gras de la famille alpha-linolénique contrôlent la structure et la fonction du cerveau : leur nature, rôle, origine et importance alimentaire. *OCL* 2, 254-263.

Bourre, J.M., Pascal, G., Durand, G., Masson, M., Dumont, O., Piciotti, M., 1984. Alterations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes, and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (myelin and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-3 fatty acids. *J Neurochem* 43(2), 342-348.

Bousquet, M., Gue, K., Emond, V., Julien, P., Kang, J.X., Cicchetti, F., Calon, F., 2011. Transgenic conversion of omega-6 into omega-3 fatty acids in a mouse model of Parkinson's disease. *J Lipid Res* 52(2), 263-271.

Bradley, M.A., Xiong-Fister, S., Markesbery, W.R., Lovell, M.A., 2012. Elevated 4-hydroxyhexenal in Alzheimer's disease (AD) progression. *Neurobiol Aging* 33(6), 1034-1044.

Breckenridge, W.C., Gombos, G., Morgan, I.G., 1972. The lipid composition of adult rat brain synaptosomal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 20(266), 695-707.

Brenna, J.T., Salem, N., Jr., Sinclair, A.J., Cunnane, S.C., 2009. alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 80, 85-91.

Brossard, N., Croset, M., Lecerf, J., Pachiaudi, C., Normand, S., Chirouze, V., Macovschi, O., Riou, J.P., Tayot, J.L., Lagarde, M., 1996. Metabolic fate of an oral tracer dose of [13C]docosahexaenoic acid triglycerides in the rat. *Am J Physiol* 270, R846-854.

Brossard, N., Croset, M., Normand, S., Pousin, J., Lecerf, J., Laville, M., Tayot, J.L., Lagarde, M., 1997. Human plasma albumin transports [13C]docosahexaenoic acid in two lipid forms to blood cells. *J Lipid Res* 38, 1571-1582.

Brossard, N., Pachiaudi, C., Croset, M., Normand, S., Lecerf, J., Chirouze, V., Riou, J.P., Tayot, J.L., Lagarde, M., 1994. Stable isotope tracer and gas-chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry to study the in vivo compartmental metabolism of docosahexaenoic acid. *Anal Biochem* 220, 192-199.

Burdge, G.C., Wootton, S.A., 2002. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br J Nutr* 88(4), 411-420.

Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* 50 Suppl, S237-242.

Burr, M.L., Fehily, A.M., Gilbert, J.F., Rogers, S., Holliday, R.M., Sweetnam, P.M., Elwood, P.C., Deadman, N.M., 1989. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 2, 757-761.

Burr, G.O., Burr, M. M., 1930. On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition, *J Biol Chem* 86, 587-621.

Catalan, J., Moriguchi, T., Slotnick, B., Murthy, M., Greiner, R.S., Salem, N., Jr., 2002. Cognitive deficits in docosahexaenoic acid-deficient rats. *Behav Neurosci* 116, 1022-1031.

Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M.P., Fenart, L., 2007. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 6, 650-661.

Cecchelli, R., Dehouck, B., Descamps, L., Fenart, L., Buee-Scherrer, V.V., Duhem, C., Lundquist, S., Renftel, M., Torpier, G., Dehouck, M.P., 1999. In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 36, 165-178.

Cedars, A., Jenkins, C.M., Mancuso, D.J., Gross, R.W., 2009. Calcium-independent phospholipases in the heart: mediators of cellular signaling, bioenergetics, and ischemia-induced electrophysiologic dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 53, 277-289.

Chauveau, F., Cho, T.H., Perez, M., Guichardant, M., Riou, A., Aguetaz, P., Picq, M., Lagarde, M., Berthezene, Y., Nighoghossian, N., Wiart, M., 2011. Brain-targeting form of docosahexaenoic acid for experimental stroke treatment: MRI evaluation and anti-oxidant impact. *Curr Neurovasc Res* 8, 95-102.

Chavko, M., Nemoto, E.M., Melick, J.A., 1993. Regional lipid composition in the rat brain. *Mol Chem Neuropathol* 18, 123-131.

Chen, C.T., Ma, D.W., Kim, J.H., Mount, H.T., Bazinet, R.P., 2008. The low density lipoprotein receptor is not necessary for maintaining mouse brain polyunsaturated fatty acid concentrations. *J Lipid Res* 49, 147-152.

Chen, P., Vericel, E., Lagarde, M., Guichardant, M., 2011. Poxyrins, a class of oxygenated products from polyunsaturated fatty acids, potentially inhibit blood platelet aggregation. *Faseb J* 25, 382-388.

Chen, S., Subbaiah, P.V., 2007. Phospholipid and fatty acid specificity of endothelial lipase: potential role of the enzyme in the delivery of docosahexaenoic acid (DHA) to tissues. *Biochim Biophys Acta* 1771, 1319-1328.

Chevreur, M.E., 1823. *Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale*, Levrault F.G. eds, Paris.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leong, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W., 1980. Extrauterine fatty acid accretion in infant brain: implications for fatty acid requirements. *Early Hum Dev* 4(2), 131-138.

Clandinin, M.T., Chappell, J.E., Leong, S., Heim, T., Swyer, P.R., Chance, G.W. 1980. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early Hum Dev* 4(2), 121-129.

Clark, J.D., Lin, L.L., Kriz, R.W., Ramesha, C.S., Sultzman, L.A., Lin, A.Y., Milona, N., Knopf, J.L., 1991. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 65, 1043-1051.

Clark, M.A., Shorr, R.G., Bomalaski, J.S., 1986. Antibodies prepared to *Bacillus cereus* phospholipase C crossreact with a phosphatidylcholine preferring phospholipase C in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 140, 114-119.

Clemens, J.A., Stephenson, D.T., Smalstig, E.B., Roberts, E.F., Johnstone, E.M., Sharp, J.D., Little, S.P., Kramer, R.M., 1996. Reactive glia express cytosolic phospholipase A2 after transient global forebrain ischemia in the rat. *Stroke* 27(3), 527-535.

Cohen, S.R., Bernsohn, J., 1978. The in vivo incorporation of linolenic acid into neuronal and glial cells and myelin. *J Neurochem* 30(4), 661-669.

Connor, W.E., Lin, D.S., Wolf, D.P., Alexander, M., 1998. Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm. *J Lipid Res* 39(7), 1404-1411.

Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., Bertino, J.R., 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 695-698.

Corey, E.J., Shih, C., Cashman, J.R., 1983. Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 3581-3584.

Creuzot-Garcher, C., Bron, A., 2008. [The place of micronutrition in glaucoma management]. *J Fr Ophtalmol* 31, 2S65-68.

Croset, M., Brossard, N., Pachiaudi, C., Normand, S., Lecerf, J., Chirouze, V., Riou, J.P., Tayot, J.L., Lagarde, M., 1996. In vivo compartmental metabolism of ¹³C-docosahexaenoic acid, studied by gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry. *Lipids* 31 Suppl, S109-115.

Croset, M., Brossard, N., Polette, A., Lagarde, M., 2000. Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem J* 345 Pt 1, 61-67.

Cummings, B.S., McHowat, J., Schnellmann, R.G., 2000. Phospholipase A(2)s in cell injury and death. *J Pharmacol Exp Ther* 294, 793-799.

Cunnane, S.C., Anderson, M.J., 1997. The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat. *J Nutr* 127, 146-152.

Czeredys, M., Mysiorek, C., Kulikova, N., Samluk, L., Berezowski, V., Cecchelli, R., Nalecz, K.A., 2008. A polarized localization of amino acid/carnitine transporter B(0,+) (ATB(0,+)) in the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 376, 267-270.

Dawson, R.M., Irvine, R.F., Hemington, N., Hirasawa, K., 1982. The stimulation of the brain alkaline phospholipase A1 attacking phosphatidylethanolamine by various salts and metal chelators. *Neurochem Res* 7, 1149-1161.

DeBault, L.E., 1981. gamma-Glutamyltranspeptidase induction mediated by glial foot process-to endothelium contact in co-culture. *Brain Res* 220, 432-435.

DeBault, L.E., Cancilla, P.A., 1980. gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science* 207, 653-655.

Decleves, X., Jacob, A., Yousif, S., Shawahna, R., Potin, S., Scherrmann, J.M., 2011. Interplay of drug metabolizing CYP450 enzymes and ABC transporters in the blood-brain barrier. *Curr Drug Metab* 12, 732-741.

Decleves, X., Regina, A., Laplanche, J.L., Roux, F., Boval, B., Launay, J.M., Scherrmann, J.M., 2000. Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 60, 594-601.

Dehouck, M.P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C., Cecchelli, R., 1990. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 54, 1798-1801.

Dejana, E., 2004. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 261-270.

de Lau, L. M., M. Bornebroek., J. C. Witteman., A. Hofman., P. J. Koudstaal., M. M. Breteler., 2005. Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease: the Rotterdam study. *Neurology* 64, 2040-2045.

Delton-Vandenbroucke, I., Grammas, P., Anderson, R.E., 1997. Polyunsaturated fatty acid metabolism in retinal and cerebral microvascular endothelial cells. *J Lipid Res* 38(1), 147-159.

DeLong, C.J., Shen, Y.J., Thomas, M.J., Cui, Z., 1999. Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway. *J Biol Chem* 274, 29683-29688.

Delorme, P., Grignon, G., Gayet, J., 1968. [Ultrastructure of the capillaries in the telencephalon of the chicken during embryogenesis and postnatal growth]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 87, 592-602.

Dennis, E.A., Kennedy, E.P., 1972. Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria. *J Lipid Res* 13, 263-267.

Dhopeswarkar, G.A., Mead, J.F., 1973. Uptake and transport of fatty acids into the brain and the role of the blood-brain barrier system. *Adv Lipid Res* 11(0), 109-142.

Diagne, A., Fauvel, J., Record, M., Chap, H., Douste-Blazy, L., 1984. Studies on ether phospholipids. II. Comparative composition of various tissues from human, rat and guinea pig. *Biochim Biophys Acta* 793(2), 221-231.

Du, Q., 2010. Optimisation des profils lipidiques du cerveau de rats déficients en oméga-3 au sevrage par l'utilisation de matière grasse laitière- Conséquences au niveau du lipidome. Université de la méditerranée Aix-Marseille II, Faculté de médecine de Marseille, UMR INRA 1260.

Dyerberg, J., Bang, H.O., 1979. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. *Lancet* 2, 433-435.

Eady, T.N., Khoutorova, L., Obenaus, A., Mohd-Yusof, A., Bazan, N.G., Belayev, L., 2014. Docosahexaenoic acid complexed to albumin provides neuroprotection after experimental stroke in aged rats. *Neurobiol Dis* 62, 1-7.

Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S., Vestweber, D., 2004. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* 117, 19-29.

Edmond, J., 2001. Essential polyunsaturated fatty acids and the barrier to the brain: the components of a model for transport. *J Mol Neurosci* 16, 181-193; discussion 215-121.

Emken, E.A., 1994. Metabolism of dietary stearic acid relative to other fatty acids in human subjects. *Am J Clin Nutr* 60(6 Suppl), 1023S-1028S.

Erlich, P., 1885. Das sauerstoffbedurfiss des organismus. Ein farbenanalistische studie. A. Hirschwald Edit. Berlin,

Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A., Anderson, J.M., 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273, 29745-29753.

Fedorova, I., Salem, N., Jr., 2006. Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75, 271-289.

Fenart, L., Buee-Scherrer, V., Descamps, L., Duhem, C., Poullain, M.G., Cecchelli, R., Dehouck, M.P., 1998. Inhibition of P-glycoprotein: rapid assessment of its implication in blood-brain barrier integrity and drug transport to the brain by an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharm Res* 15, 993-1000.

Fewster, M.E., Ihrig, T., Mead, J.F., 1975. Biosynthesis of long chain fatty acids by oligodendroglia isolated from bovine white matter. *J Neurochem* 25(3), 207-213.

Fleith, M., Clandinin, M.T., 2005. Dietary PUFA for preterm and term infants: review of clinical studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45(3), 205-229.

Fossati, P., Prencipe, L., 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 28, 2077-2080.

Frasch, S.C., Zemski-Berry, K., Murphy, R.C., Borregaard, N., Henson, P.M., Bratton, D.L., 2007. Lysophospholipids of different classes mobilize neutrophil secretory vesicles and induce redundant signaling through G2A. *J Immunol* 178, 6540-6548.

Freeman, M.R., 2010. Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* 330, 774-778.

Freund-Levi, Y., Eriksdotter-Jonhagen, M., Cederholm, T., Basun, H., Faxen-Irving, G., Garlind, A., Vedin, I., Vessby, B., Wahlund, L.O., Palmblad, J., 2006. Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial. *Arch Neurol* 63, 1402-1408.

Freund Levi, Y., Vedin, I., Cederholm, T., Basun, H., Faxen Irving, G., Eriksdotter, M., Hjorth, E., Schultzberg, M., Vessby, B., Wahlund, L.O., Salem, N., Jr., Palmblad, J., 2014. Transfer of omega-3 fatty acids across the blood-brain barrier after dietary supplementation with a docosahexaenoic acid-rich omega-3 fatty acid preparation in patients with Alzheimer's disease: the OmegAD study. *J Intern Med* 275, 428-436.

Frey, A., Meckelein, B., Weiler-Guttler, H., Mockel, B., Flach, R., Gassen, H.G., 1991. Pericytes of the brain microvasculature express gamma-glutamyl transpeptidase. *Eur J Biochem* 202, 421-429.

Fukami, K., Inanobe, S., Kanemaru, K., Nakamura, Y., 2010. Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog Lipid Res* 49, 429-437.

Furuse, M., 2010. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002907.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123, 1777-1788.

Gallai-Hatchard, J., Magee, W.L., Thompson, R.H., Webster, G.R., 1962. The formation of lysophosphatides from di-acyl phosphatides by brain preparations. *J Neurochem* 9, 545-554.

Gao, X., Chen, H., Fung, T.T., Logroscino, G., Schwarzschild, M.A., Hu, F.B., Ascherio, A., 2007. Prospective study of dietary pattern and risk of Parkinson disease. *Am J Clin Nutr* 86, 1486-1494.

Gao, F., Kiesewetter, D., Chang, L., Ma, K., Bell, J.M., Rapoport, S.I., Igarashi, M., 2009. Whole-body synthesis-secretion rates of long-chain n-3 PUFAs from circulating unesterified alpha-linolenic acid in unanesthetized rats. *J Lipid Res* 50(4), 749-758.

Garcia, M.C., Ward, G., Ma, Y.C., Salem, N. Jr., Kim, H.Y., 1998. Effect of docosahexaenoic acid on the synthesis of phosphatidylserine in rat brain in microsomes and C6 glioma cells. *J Neurochem* 70(1), 24-30.

- Gendaszewska-Darmach, E., 2008. Lysophosphatidic acids, cyclic phosphatidic acids and autotaxin as promising targets in therapies of cancer and other diseases. *Acta Biochim Pol* 55, 227-240.
- Gherzi-Egea, J.F., Leininger-Muller, B., Cecchelli, R., Fenstermacher, J.D., 1995. Blood-brain interfaces: relevance to cerebral drug metabolism. *Toxicol Lett* 82-83, 645-653.
- Ghosh, M., Tucker, D.E., Burchett, S.A., Leslie, C.C., 2006. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog Lipid Res* 45, 487-510.
- Glomset, J.A., 1962. The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: plasma fatty acid transferase. *Biochim Biophys Acta* 65, 128-135.
- Glynn, P., 2005. Neuropathy target esterase and phospholipid deacylation. *Biochim Biophys Acta* 1736, 87-93.
- Goldmann, E.E., 1913. Vitalfärbung am zentral nerven system. Beitrag zur physiologie des plexus choroïdus und der hirnhaut, Berlin.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., Jaramillo, B.E., 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81, 1-44.
- Gottesman, M.M., Hrycyna, C.A., Schoenlein, P.V., Germann, U.A., Pastan, I., 1995. Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu Rev Genet* 29, 607-649.
- Graf, B.A., Duchateau, G.S., Patterson, A.B., Mitchell, E.S., van Bruggen, P., Koek, J.H., Melville, S., Verkade, H.J., 2010. Age dependent incorporation of 14C-DHA into rat brain and body tissues after dosing various 14C-DHA-esters. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 83, 89-96.
- Grandmaison, P.A., Nanowski, T.S., Vance, J.E., 2004. Externalization of phosphatidylserine during apoptosis does not specifically require either isoform of phosphatidylserine synthase. *Biochim Biophys Acta* 1636, 1-11.
- Grechkin, A., 1998. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res* 37(5), 317-352.
- Green, J.T., Orr, S.K., Bazinet, R.P., 2008. The emerging role of group VI calcium-independent phospholipase A2 in releasing docosahexaenoic acid from brain phospholipids. *J Lipid Res* 49, 939-944.
- Greenwood, A.F., Powers, R.E., Jope, R.S., 1995. Phosphoinositide hydrolysis, G alpha q, phospholipase C, and protein kinase C in post mortem human brain: effects of post mortem interval, subject age, and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 69, 125-138.
- Gustavsson, L., Hansson, E., 1990. Stimulation of phospholipase D activity by phorbol esters in cultured astrocytes. *J Neurochem* 54(3), 737-742.

- Halassa, M.M., Haydon, P.G., 2010. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol* 72, 335-355.
- Hamilton, J.A., Brunaldi, K., 2007. A model for fatty acid transport into the brain. *J Mol Neurosci* 33, 12-17.
- Han, K.H., Hong, K.H., Ko, J., Rhee, K.S., Hong, M.K., Kim, J.J., Kim, Y.H., Park, S.J., 2004. Lysophosphatidylcholine up-regulates CXCR4 chemokine receptor expression in human CD4 T cells. *J Leukoc Biol* 76, 195-202.
- Harrington, G.W., Holz, G.G., Jr., 1968. The monoenoic and docosahexaenoic fatty acids of a heterotrophic dinoflagellate. *Biochim Biophys Acta* 164, 137-139.
- Hatch, G.M., 1994. Cardiolipin biosynthesis in the isolated heart. *Biochem J* 297(Pt1), 201-208.
- Hattori, H., Bansal, V.S., Orihel, D., Kanfer, J.N., 1984. Presence of phospholipid-N-methyltransferases and base-exchange enzymes in rat central nervous system axolemma-enriched fractions. *J Neurochem* 43(4), 1018-1024.
- Hawkins, B.T., Davis, T.P., 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57, 173-185.
- Hirasawa, K., Irvine, R.F., Dawson, R.M., 1981. The catabolism of phosphatidylinositol by an EDTA-insensitive phospholipase A1 and calcium-dependent phosphatidylinositol phosphodiesterase in rat brain. *Eur J Biochem* 120(1), 53-58.
- Hirase, T., Staddon, J.M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., Rubin, L.L., 1997. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 110 (Pt 14), 1603-1613.
- Hirashima, Y., Farooqui, A.A., Mills, J.S., Horrocks, L.A., 1992. Identification and purification of calcium-independent phospholipase A2 from bovine brain cytosol. *J Neurochem* 59(2), 708-714.
- Hirata, F., Axelrod, J., 1980. Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science* 209, 1082-1090.
- Hishikawa, D., Hashidate, T., Shimizu, T., Shindou, H., 2014. Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J Lipid Res* 55, 799-807.
- Hoffman, D.R., Birch, D.G., 1995. Docosahexaenoic acid in red blood cells of patients with X-linked retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(6), 1009-1018.
- Holman, R.T., 1964. Nutritional and Metabolic Interrelationships between Fatty Acids. *Fed Proc* 23, 1062-1067.

Hong, S.H., Khoutorova, L., Bazan, N.G., Belayev, L., 2015. Docosahexaenoic acid improves behavior and attenuates blood-brain barrier injury induced by focal cerebral ischemia in rats. *Exp Transl Stroke Med* 28, 7(1):3.

Hong, S., Gronert, K., Devchand, P.R., Moussignac, R.L., Serhan, C.N., 2003. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem* 278, 14677-14687.

Hong, S.H., Belayev, L., Khoutorova, L., Obenaus, A., Bazan, N.G., 2014. Docosahexaenoic acid confers enduring neuroprotection in experimental stroke. *J Neurol Sci* 338, 135-141.

Horwitz, J., Davis, L.L., 1993. The substrate specificity of brain microsomal phospholipase D. *Biochem J* 295 (Pt 3):793-798.

Huber, J.D., Egleton, R.D., Davis, T.P., 2001. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 24, 719-725.

Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E., Higgins, C.F., 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346, 362-365.

Innis, S.M., 2000. The role of dietary n-6 and n-3 fatty acids in the developing brain. *Dev Neurosci* 22(5-6), 474-480.

Inoko, A., Itoh, M., Tamura, A., Matsuda, M., Furuse, M., Tsukita, S., 2003. Expression and distribution of ZO-3, a tight junction MAGUK protein, in mouse tissues. *Genes Cells* 8, 837-845.

Itoh, M., Bissell, M.J., 2003. The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8, 449-462.

Jang, H.J., Yang, Y.R., Kim, J.K., Choi, J.H., Seo, Y.K., Lee, Y.H., Lee, J.E., Ryu, S.H., Suh, P.G., 2013. Phospholipase C- γ 1 involved in brain disorders. *Adv Biol Regul* 53(1), 51-62.

Janzer, R.C., Raff, M.C., 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325, 253-257.

Jelsema, C.L., Morre, D.J., 1978. Distribution of phospholipid biosynthetic enzymes among cell components of rat liver. *J Biol Chem* 253, 7960-7971.

Jenkins, G.M., Frohman, M.A., 2005. Phospholipase D: a lipid centric review. *Cell Mol Life Sci* 62, 2305-2316.

Jump, D.B., Depner, C.M., 2012. Tripathy S. Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease. *J Lipid Res* 53(12), 2525-2545.

Kainu, V., Hermansson, M., Somerharju, P., 2008. Electrospray ionization mass spectrometry and exogenous heavy isotope-labeled lipid species provide detailed information on aminophospholipid acyl chain remodeling. *J Biol Chem* 283, 3676-3687.

Kaminski, W.E., Piehler, A., Wenzel, J.J., 2006. ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta* 1762, 510-524.

Karanian, J.W., Kim, H.Y., Salem, N., Jr., 1996. The structure-activity relationship of lipoxygenase products of long-chain polyunsaturated fatty acids: effects on human platelet aggregation. *Lipids* 31 Suppl, S305-308.

Katz, A.M., Messineo, F.C., 1981. Lipids and membrane function: implications in arrhythmias. *Hosp Pract (Off Ed)* 16, 49-59.

Kelley, D.S., Siegel, D., Vemuri, M., Mackey, B.E., 2007. Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men. *Am J Clin Nutr* 86(2), 324-333.

Kitson, A.P., Stark, K.D., Duncan, R.E., 2012. Enzymes in brain phospholipid docosahexaenoic acid accretion: a PL-ethora of potential PL-ayers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 87, 1-10.

Kiyasu, J.Y., Pieringer, R.A., Paulus, H., Kennedy, E.P., 1963. The biosynthesis of phosphatidylglycerol. *J Biol Chem* 238, 2293-2298.

Klopfenstein, W.E., 1969. Enthalpy change of binding lysolecithin to serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 181(1), 323-325.

Konradi, C., Riederer, P., Jellinger, K., Denney, R., 1987. Cellular action of MAO inhibitors. *J Neural Transm Suppl* 25, 15-25.

Kramer, R.M., Deykin, D., 1983. Arachidonoyl transacylase in human platelets. Coenzyme A-independent transfer of arachidonate from phosphatidylcholine to lysoplasmylethanolamine. *J Biol Chem* 258, 13806-13811.

Kuhl, W.E., Spector, A.A., 1970. Uptake of long-chain fatty acid methyl esters by mammalian cells. *J Lipid Res* 11(5), 458-465.

Kühn, H., Saam, J., Eibach, S., Holzhütter, H.G., Ivanov, I., Walther, M., 2005. Structural biology of mammalian lipoxygenases: enzymatic consequences of targeted alterations of the protein structure. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 93-101.

Kühn, H., Thiele, B.J., 1999. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* 449, 7-11.

Kurtz, A., Zimmer, A., Schnütgen, F., Brüning, G., Spener, F., Müller, T., 1994. The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* 120(9), 2637-2649.

LaDu, M.J., Gilligan, S.M., Lukens, J.R., Cabana, V.G., Reardon, C.A., Van Eldik, L.J., Holtzman, D.M., 1998. Nascent astrocyte particles differ from lipoproteins in CSF. *J Neurochem* 70, 2070-2081.

Lagarde, M., 2008. Docosahexaenoic acid: Nutrient and precursor of bioactive lipids. *Eur J Lipid Sci Technol* 110, 673-678.

Lagarde, M., Bernoud, N., Brossard, N., Lemaitre-Delaunay, D., Thies, F., Croset, M., Lecerf, J., 2001. Lysophosphatidylcholine as a preferred carrier form of docosahexaenoic acid to the brain. *J Mol Neurosci* 16, 201-204; discussion 215-221.

Lagarde, M., Bryon, P.A., Guichardant, M., Dechavanne, M., 1980. A simple and efficient method for platelet isolation from their plasma. *Thromb Res* 17, 581-588.

Lagarde, M., Guichardant, M., Picq, M., Doutheau, A., Michaud, S., 2006. Brevet 06.09929. Procédé de préparation d'acetyl,docosahexaenoyl-glycerophosphocholine et son utilisation pour l'apport d'acides gras polyinsaturés.

Lagarde, M., Hachem, M., Bernoud-Hubac, N., Picq, M., Véricel, E., Guichardant, M., 2015. Biological properties of a DHA-containing structured phospholipid (AceDoPC) to target the brain. *Prost Leuk and Ess Fatty Acids* 92, 63-65.

Lagarde, M., Véricel, E., Picq, M., Bernoud-Hubac, N., Guichardant, M., 2011. Brevet 11.58149. Phosphatidylcholines en tant que modulateurs de l'activité du facteur d'activation plaquettaire.

Lai, F.M., Udenfriend, S., Spector, S., 1975. Presence of norepinephrine and related enzymes in isolated brain microvessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 4622-4625.

Lands, W.E., Merkl, I., 1963. Metabolism of glycerolipids. III. Reactivity of various acyl esters of coenzyme A with alpha'-acylglycerophosphorylcholine, and positional specificities in lecithin synthesis. *J Biol Chem* 238, 898-904.

Larsen, G.L., Henson, P.M., 1983. Mediators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 1, 335-359.

Lawrenson, J.G., Reid, A.R., Finn, T.M., Orte, C., Allt, G., 1999. Cerebral and pial microvessels: differential expression of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase. *Anat Embryol (Berl)* 199, 29-34.

Leaf, A., Kang, J.X., Xiao, Y.F., Billman, G.E., Voskuyl, R.A., 1999. Functional and electrophysiologic effects of polyunsaturated fatty acids on excitable tissues: heart and brain. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 60, 307-312.

Lee, S.W., Kim, W.J., Choi, Y.K., Song, H.S., Son, M.J., Gelman, I.H., Kim, Y.J., Kim, K.W., 2003. SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med* 9, 900-906.

- Lee, T.H., Mencia-Huerta, J.M., Shih, C., Corey, E.J., Lewis, R.A., Austen, K.F., 1984. Effects of exogenous arachidonic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic acids on the generation of 5-lipoxygenase pathway products by ionophore-activated human neutrophils. *J Clin Invest* 74, 1922-1933.
- Lei, X., Barbour, S.E., Ramanadham, S., 2010. Group VIA Ca^{2+} -independent phospholipase A2 (iPLA2 β) and its role in beta-cell programmed cell death. *Biochimie* 92, 627-637.
- Lemaitre-Delaunay, D., Pachiaudi, C., Laville, M., Pousin, J., Armstrong, M., Lagarde, M., 1999. Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [(13)C]DHA in phosphatidylcholine. *J Lipid Res* 40, 1867-1874.
- Leonard, A.E., Pereira, S.L., Sprecher, H., Huang, Y.S., 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 43, 36-54.
- Levy, B.D., Kohli, P., Gotlinger, K., Haworth, O., Hong, S., Kazani, S., Israel, E., Haley, K.J., Serhan, C.N., 2007. Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness. *J Immunol* 178, 496-502.
- Lim, S.Y., Hoshiba, J., Moriguchi, T., Salem, N.Jr., 2005. N-3 fatty acid deficiency induced by a modified artificial rearing method leads to poorer performance in spatial learning tasks. *Pediatr Res* 58, 741-748.
- Lin, T., Islam, O., Heese, K., 2006. ABC transporters, neural stem cells and neurogenesis--a different perspective. *Cell Res* 16, 857-871.
- Lindsley, C.W., Brown, H.A., 2012. Phospholipase D as a therapeutic target in brain disorders. *Neuropsychopharmacology* 37(1), 301-302.
- Lippoldt, A., Liebner, S., Andbjør, B., Kalbacher, H., Wolburg, H., Haller, H., Fuxe, K., 2000. Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell tight junctions and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C. *Neuroreport* 11, 1427-1431.
- Liu, L., Bartke, N., Van Daele, H., Lawrence, P., Qin, X., Park, H.G., Kothapalli, K., Windust, A., Bindels, J., Wang, Z., Brenna, J.T., 2014. Higher efficacy of dietary DHA provided as a phospholipid than as a triglyceride for brain DHA accretion in neonatal piglets. *J Lipid Res* 55, 531-539.
- Liu, M., Boussetta, T., Makni-Maalej, K., Fay, M., Driss, F., El-Benna, J., Lagarde, M., Guichardant, M., 2014. Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ROS production in human neutrophils and cyclooxygenase activities. *Lipids* 49(1), 49-57.
- Lukiw, W.J., Cui, J.G., Marcheselli, V.L., Bodker, M., Botkjaer, A., Gotlinger, K., Serhan, C.N., Bazan, N.G., 2005. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115(10), 2774-2783.

Lundquist, S., Renftel, M., Brillault, J., Fenart, L., Cecchelli, R., Dehouck, M.P., 2002. Prediction of drug transport through the blood-brain barrier in vivo: a comparison between two in vitro cell models. *Pharm Res* 19, 976-981.

MacDonald, J.I., Sprecher, H., 1991. Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1084, 105-121.

Mangoura, D., Dawson, G., 1993. Opioid peptides activate phospholipase D and protein kinase C-epsilon in chicken embryo neuron cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(7), 2915-2919.

Mansfeld, J., Ulbrich-Hofmann, R., 2009. Modulation of phospholipase D activity in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1791, 913-926.

Marangoni, F., Poli, A., 2013. n-3 fatty acids: functional differences between food intake, oral supplementation and drug treatments. *Int J Cardiol* 170, S12-15.

Marcheselli, V.L., Hong, S., Lukiw, W.J., Tian, X.H., Gronert, K., Musto, A., Hardy, M., Gimenez, J.M., Chiang, N., Serhan, C.N., Bazan, N.G., 2003. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 278, 43807-43817.

Marchioli, R., Levantesi, G., 2013. n-3 PUFAs in cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 20;170(2 Suppl 1):S33-8.

Marchioli, R., Barzi, F., Bomba, E., Chieffo, C., Di Gregorio, D., Di Mascio, R., Franzosi, M.G., Geraci, E., Levantesi, G., Maggioni, A.P., Mantini, L., Marfisi, R.M., Mastrogiuseppe, G., Mininni, N., Nicolosi, G.L., Santini, M., Schweiger, C., Tavazzi, L., Tognoni, G., Tucci, C., Valagussa, F., 2002. Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* 105, 1897-1903.

Martinod, S., 2010. DHA et système nerveux : État des lieux. Arcanatura LLC, University of Connecticut TIP 1084 Shennecosset Road Groton, CT 06340 USA. 1-13.

Masuzawa, Y., Sugiura, T., Sprecher, H., Waku, K., 1989. Selective acyl transfer in the reacylation of brain glycerophospholipids. Comparison of three acylation systems for 1-alk-1'-enylglycero-3-phosphoethanolamine, 1-acylglycero-3-phosphoethanolamine and 1-acylglycero-3-phosphocholine in rat brain microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1005, 1-12.

McLennan, P.L., Abeywardena, M.Y., Charnock, J.S., 1988. Dietary fish oil prevents ventricular fibrillation following coronary artery occlusion and reperfusion. *Am Heart J* 116, 709-717.

McManus, L.M., Deavers, S.I., 1989. Platelet activating factor in pulmonary pathobiology. *Clin Chest Med* 10, 107-118.

McMurray, H.F., Parthasarathy, S., Steinberg, D., 1993. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 92, 1004-1008.

McNamara, R.K., Carlson, S.E., 2006. Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75(4-5), 329-349.

Meresse, S., Dehouck, M.P., Delorme, P., Bensaid, M., Tauber, J.P., Delbart, C., Fruchart, J.C., Cecchelli, R., 1989. Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J Neurochem* 53, 1363-1371.

Meyer, J., Mischeck, U., Veyhl, M., Henzel, K., Galla, H.J., 1990. Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res* 514, 305-309.

Morash, S.C., Cook, H.W., Spence, M.W., 1989. Lysophosphatidylcholine as an intermediate in phosphatidylcholine metabolism and glycerophosphocholine synthesis in cultured cells: an evaluation of the roles of 1-acyl- and 2-acyl-lysophosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1004(2), 221-229.

Morita, M., Kuba, K., Ichikawa, A., Nakayama, M., Katahira, J., Iwamoto, R., Watanebe, T., Sakabe, S., Daidoji, T., Nakamura, S., Kadowaki, A., Ohto, T., Nakanishi, H., Taguchi, R., Nakaya, T., Murakami, M., Yoneda, Y., Arai, H., Kawaoka, Y., Penninger, J.M., Arita, M., Imai, Y., 2013. The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell* 153(1), 112-125.

Moore, S.A., Yoder, E., Spector, A.A., 1990. Role of the blood-brain barrier in the formation of long-chain omega-3 and omega-6 fatty acids from essential fatty acid precursors. *J Neurochem* 55, 391-402.

Moore, S.A., Yoder, E., Murphy, S., Dutton, G.R., Spector, A.A., 1991. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6). *J Neurochem* 56(2), 518-524.

Morale, S.E., Hoffman, D.R., Castaneda, Y.S., Wheaton, D.H., Burns, R.A., Birch, E.E., 2005. Duration of long-chain polyunsaturated fatty acids availability in the diet and visual acuity. *Early Hum Dev* 81(2), 197-203.

Moreno, C., Macias, A., Prieto, A., de la Cruz, A., Gonzalez, T., Valenzuela, C., 2012. Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Cardiac Ion Channels. *Front Physiol* 3, 245.

Morrison, W.R., Smith, L.M., 1964. Identification of Ceramide Monohexoside and Ceramide Dihexoside in Bovine Milk. *Biochim Biophys Acta* 84, 759-761.

Mukherjee, P.K., Marcheselli, V.L., Serhan, C.N., Bazan, N.G., 2004. Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8491-8496.

Muoio, V., Persson, P.B., Sendeski, M.M., 2014. The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol (Oxf)* 210, 790-798.

Murakami, M., Kudo, I., 2002. Phospholipase A2. *J Biochem* 131, 285-292.

Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K., Kudo, I., 1997. Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit Rev Immunol* 17, 225-283.

Nelson, G.J., 1967. The phospholipid composition of plasma in various mammalian species. *Lipids* 2, 323-328.

Neuringer, M., Connor, W.E., Lin, D.S., Barstad, L., Luck, S., 1986. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4021-4025.

Nguyen, L.N., Ma, D., Shui, G., Wong, P., Cazenave-Gassiot, A., Zhang, X., Wenk, M.R., Goh, E.L., Silver, D.L., 2014. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 509, 503-506.

Noy, N., Donnelly, T.M., Zakim, D., 1986. Physical-chemical model for the entry of water-insoluble compounds into cells. Studies of fatty acid uptake by the liver. *Biochemistry* 25(8):2013-2021.

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., Tsukita, S., 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161, 653-660.

Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., Ransom, B.R., Goldman, S.A., Nedergaard, M., 2009. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 29, 3276-3287.

O'brien, J.S., Sampson, E.L., 1965. Lipid composition of normal human: gray matter, white matter and myelin. *J Lipid Res* 6, 537-544.

O'Connor, D.L., Hall, R., Adamkin, D., Auestad, N., Castillo, M., Connor, W.E., Connor, S.L., Fitzgerald, K., Groh-Wargo, S., Hartmann, E.E., Jacobs, J., Janowsky, J., Lucas, A., Margeson, D., Mena, P., Neuringer, M., Nesin, M., Singer, L., Stephenson, T., Szabo, J., Zemon V; Ross Preterm Lipid Study 2001. Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective, randomized controlled trial. *Pediatrics* 108(2), 359-371.

Ohtsuki, S., Yamaguchi, H., Katsukura, Y., Asashima, T., Terasaki, T., 2008. mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J Neurochem* 104, 147-154.

Ojima, A., Nakagawa, Y., Sugiura, T., Masuzawa, Y., Waku, K., 1987. Selective transacylation of 1-O-alkylglycerophosphoethanolamine by docosahexaenoate and arachidonate in rat brain microsomes. *J Neurochem* 48(5), 1403-1410.

Oldendorf, W.H., Cornford, M.E., Brown, W.J., 1977. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1, 409-417.

Onuma, Y., Masuzawa, Y., Ishima, Y., Waku, K., 1984. Selective incorporation of docosahexaenoic acid in rat brain. *Biochim Biophys Acta* 793, 80-85.

Ouellet, M., Emond, V., Chen, C.T., Julien, C., Bourasset, F., Oddo, S., LaFerla, F., Bazinet, R.P., Calon, F., 2009. Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: An in situ cerebral perfusion study. *Neurochem Int* 55, 476-482.

Pardridge, W.M., 2005. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2, 3-14.

Patel, S.C., Asotra, K., Patel, Y.C., McConathy, W.J., Patel, R.C., Suresh, S., 1995. Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D. *Neuroreport* 6, 653-657.

Pawlosky, R.J., Hibbeln, J.R., Novotny, J.A., Salem, N.Jr., (2001). Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J Lipid Res* 42(8), 1257-1265.

Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*, fourth edition.

Peet, M., Stokes, C., 2005. Omega-3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders. *Drugs* 65(8), 1051-1059.

Pete, M.J., Ross, A.H., Exton, J.H., 1994. Purification and properties of phospholipase A1 from bovine brain. *J Biol Chem* 269, 19494-19500.

Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Foss, D., Mahley, R.W., 1987. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 917, 148-161.

Plateel, M., Teissier, E., Cecchelli, R., 1997. Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J Neurochem* 68(2), 874-877.

Polette, A., Deshayes, C., Chantegrel, B., Croset, M., Armstrong, J.M., Lagarde M., 1999. Synthesis of acetyl,docosahexaenoyl-glycerophosphocholine and its characterization using nuclear magnetic resonance. *Lipids* 34(12), 1333-1337.

Portman, O.W., Illingworth, D.R., 1974. Metabolism of lysolecithin in vivo and in vitro with particular emphasis on the arterial wall. *Biochim Biophys Acta* 348, 136-144.

Rahman, T., Taha, A.Y., Song, B.J., Orr, S.K., Liu, Z., Chen, C.T., Bazinet, R.P., 2010. The very low density lipoprotein receptor is not necessary for maintaining brain polyunsaturated fatty acid concentrations. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82, 141-145.

Rapoport, S.I., Rao, J.S., Igarashi, M., 2007. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77, 251-261.

Rapoport, S.I., Igarashi, M., Gao, F., 2010. Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 82, 273-276.

Reddy, T.S., Bazan, N.G., 1984. Activation of polyunsaturated fatty acids by rat tissues in vitro. *Lipids* 19, 987-989.

Reddy, T.S., Bazan, N.G., 1985. Synthesis of arachidonoyl coenzyme A and docosahexaenoyl coenzyme A in synaptic plasma membranes of cerebrum and microsomes of cerebrum, cerebellum, and brain stem of rat brain. *J Neurosci Res* 13, 381-390.

Reese, T.S., Karnovsky, M.J., 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34(1), 207-217.

Risau, W., Dingler, A., Albrecht, U., Dehouck, M.P., Cecchelli, R., 1992. Blood-brain barrier pericytes are the main source of gamma-glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries. *J Neurochem* 58, 667-672.

Robert, J., Rebel, G., Mandel, P., 1977. Essential fatty acid metabolism in cultured astroblasts. *Biochimie* 59(4), 417-423.

Roberts, L.J. 2nd., Montine, T.J., Markesbery, W.R., Tapper, A.R., Hardy, P., Chemtob, S., Dettbarn, W.D., Morrow, J.D., 1998. Formation of isoprostane-like compounds (neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 273(22), 13605-13612.

Ronaldson, P.T., Bendayan, M., Gingras, D., Piquette-Miller, M., Bendayan, R., 2004. Cellular localization and functional expression of P-glycoprotein in rat astrocyte cultures. *J Neurochem* 89, 788-800.

Rooke, J.A., Webster, G.R., 1976. Phospholipase A in human brain: A1-type at alkaline pH. *J Neurochem* 27, 613-620.

Ross, B.M., Kish, S.J., 1994. Characterization of lysophospholipid metabolizing enzymes in human brain. *J Neurochem* 63, 1839-1848.

Ross, B.M., Moszczynska, A., Blusztajn, J.K., Sherwin, A., Lozano, A., Kish, S.J., 1997. Phospholipid biosynthetic enzymes in human brain. *Lipids* 32, 351-358.

Saito, M., Kanfer, J., 1973. Solubilization and properties of a membrane-bound enzyme from rat brain catalyzing a base-exchange reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 17, 53(2):391-398.

Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Tsukita, S., 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* 137, 1393-1401.

SanGiovanni, J. P., Chew, E.Y., 2005. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res* 24(1), 87-138.

Santamarina-Fojo, S., Remaley, A.T., Neufeld, E.B., Brewer, H.B., Jr., 2001. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J Lipid Res* 42, 1339-1345.

Sarda, N., Gharib, A., Moliere, P., Grange, E., Bobillier, P., Lagarde, M., 1991. Docosaehaenoic acid (cervonic acid) incorporation into different brain regions in the awake rat. *Neurosci Lett* 123(1), 57-60.

Sastry, P.S., 1985. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24, 69-176.

Sawazaki, S., Salem, N., Jr., Kim, H.Y., 1994. Lipoxygenation of docosaehaenoic acid by the rat pineal body. *J Neurochem* 62, 2437-2447.

Schinkel, A.H., Jonker, J.W., 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 3-29.

Schlachetzki, F., Pardridge, W.M., 2003. P-glycoprotein and caveolin-1 α in endothelium and astrocytes of primate brain. *Neuroreport* 14, 2041-2046.

Schlame, M., Hostetler, K.Y., 1997. Cardiolipin synthase from mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1348(1-2), 207-213.

Schwab, J.M., Chiang, N., Arita, M., Serhan, C.N., 2007. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869-874.

Scott, B.L., Bazan, N.G., 1989. Membrane docosaehaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(8), 2903-2907.

Selivonchick, D.P., Roots, B.I., 1977. Lipid and fatty acyl composition of rat brain capillary endothelia isolated by a new technique. *Lipids* 12, 165-169.

Serhan, C.N., Clish, C.B., Brannon, J., Colgan, S.P., Chiang, N., Gronert, K., 2000. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 192, 1197-1204.

Serhan, C.N., Dalli, J., Colas, R.A., Winkler, J.W., Chiang, N., 2014. Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. *Biochim Biophys Acta*.

Serhan, C.N., Gotlinger, K., Hong, S., Lu, Y., Siegelman, J., Baer, T., Yang, R., Colgan, S.P., Petasis, N.A., 2006. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J Immunol* 176, 1848-1859.

Serhan, C.N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S.P., Devchand, P.R., Mirick, G., Moussignac, R.L., 2002. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 196, 1025-1037.

Serhan, C.N., Yang, R., Martinod, K., Kasuga, K., Pillai, P.S., Porter, T.F., Oh, S.F., Spite, M., 2009. Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *J Exp Med* 206, 15-23.

Shichiri, M., 2014. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. *J Clin Biochem Nutr* 54(3), 151-160.

Siddiqui, R.A., Exton, J.H., 1992. Phospholipid base exchange activity in rat liver plasma membranes. Evidence for regulation by G-protein and P2y-purinergic receptor. *J Biol Chem* 267, 5755-5761.

Siddiqui, R.A., Zerouga, M., Wu, M., Castillo, A., Harvey, K., Zaloga, G.P., Stillwell, W., 2005. Anticancer properties of propofol-docosahexaenoate and propofol-eicosapentaenoate on breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 7, R645-654.

Sinclair, A.J., 1975. Incorporation of radioactive polyunsaturated fatty acids into liver and brain of developing rat. *Lipids* 10, 175-184.

Sinclair, A.J., Crawford, M.A., 1972. The accumulation of arachidonate and docosahexaenoate in the developing rat brain. *J Neurochem* 19, 1753-1758.

Song, W.L., Lawson, J.A., Reilly, D., Rokach, J., Chang, C.T., Giasson, B., FitzGerald, G.A., 2008. Neurofurans, novel indices of oxidant stress derived from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 283(1), 6-16.

Sovic, A., Panzenboeck, U., Wintersperger, A., Kratzer, I., Hammer, A., Levak-Frank, S., Frank, S., Rader, D.J., Malle, E., Sattler, W., 2005. Regulated expression of endothelial lipase by porcine brain capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier. *J Neurochem* 94(1), 109-119.

Spector, A.A., 2001. Plasma free fatty acid and lipoproteins as sources of polyunsaturated fatty acid for the brain. *J Mol Neurosci* 16, 159-165; discussion 215-121.

Spooner, P.J., Gantz, D.L., Hamilton, J.A., Small, D.M., 1990. The distribution of oleic acid between chylomicron-like emulsions, phospholipid bilayers, and serum albumin. A model for fatty acid distribution between lipoproteins, membranes, and albumin. *J Biol Chem* 265(21), 12650-12655.

Sprecher H., 1981. Biochemistry of essential fatty acids. *Prog Lipid Res* 20, 13-22.

Srivastava, R.A., 2003. Scavenger receptor class B type I expression in murine brain and regulation by estrogen and dietary cholesterol. *J Neurol Sci* 210, 11-18.

Staud, F., Ceckova, M., Micuda, S., Pavek, P., 2010. Expression and function of p-glycoprotein in normal tissues: effect on pharmacokinetics. *Methods Mol Biol* 596, 199-222.

Stephenson, D.T., Manetta, J.V., White, D.L., Chiou, X.G., Cox, L., Gitter, B., May, P.C., Sharp, J.D., Kramer, R.M., Clemens, J.A., 1994. Calcium-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) is expressed in human brain astrocytes. *Brain Res* 637(1-2), 97-105.

Subbaiah, P.V., Sowa, J.M., Davidson, M.H., 2004. Evidence for altered positional specificity of LCAT in vivo: studies with docosahexaenoic acid feeding in humans. *J Lipid Res* 45(12), 2245-2251.

Sugiura, T., Masuzawa, Y., Waku, K., 1988. Coenzyme A-dependent transacylation system in rabbit liver microsomes. *J Biol Chem* 263, 17490-17498.

Suh, P.G., Park, J.I., Manzoli, L., Cocco, L., Peak, J.C., Katan, M., Fukami, K., Kataoka, T., Yun, S., Ryu, S.H., 2008. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep* 41, 415-434.

Sun, Y., Lee, J.H., Kim, N.H., Lee, C.W., Kim, M.J., Kim, S.H., Huh, S.O., 2009. Lysophosphatidylcholine-induced apoptosis in H19-7 hippocampal progenitor cells is enhanced by the upregulation of Fas Ligand. *Biochim Biophys Acta* 1791, 61-68.

Swanson, J.E., Lokesh, B.R., Kinsella, J.E., 1989. Ca²⁺-Mg²⁺ ATPase of mouse cardiac sarcoplasmic reticulum is affected by membrane n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid content. *J Nutr* 119, 364-372.

Takahara, N., Kashiwagi, A., Maegawa, H., Shigeta, Y., 1996. Lysophosphatidylcholine stimulates the expression and production of MCP-1 by human vascular endothelial cells. *Metabolism* 45, 559-564.

Tao-Cheng, J.H., Nagy, Z., Brightman, M.W., 1987. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J Neurosci* 7, 3293-3299.

Thies, F., Delachambre, M.C., Bentejac, M., Lagarde, M., Lecerf, J., 1992. Unsaturated fatty acids esterified in 2-acyl-1-lysophosphatidylcholine bound to albumin are more efficiently taken up by the young rat brain than the unesterified form. *J Neurochem* 59, 1110-1116.

Thies, F., Pillon, C., Moliere, P., Lagarde, M., Lecerf, J., 1994. Preferential incorporation of sn-2 lysoPC DHA over unesterified DHA in the young rat brain. *Am J Physiol* 267, R1273-1279.

Tinoco, J., 1982. Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid in animals. *Prog Lipid Res* 21, 1-45.

Tsvetnitsky, V., Auchi, L., Nicolaou, A., Gibbons, W.A., 1995. Characterization of phospholipid methylation in rat brain myelin. *Biochem J* 307(Pt 1), 239-244.

Ueda, H., Kobayashi, T., Kishimoto, M., Tsutsumi, T., Watanabe, S., Okuyama, H., 1993. The presence of Ca(2+)-independent phospholipase A1 highly specific for phosphatidylinositol in bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 195(3), 1272-1279.

Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S., Barres, B.A., 2001. Control of synapse number by glia. *Science* 291, 657-661.

Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M., Tsukita, S., 2004. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem* 279, 44785-44794.

Utsunomiya, A., Owada, Y., Yoshimoto, T., Kondo, H., 1997. Localization of mRNA for fatty acid transport protein in developing and mature brain of rats. *Brain Res Mol Brain Res* 46(1-2), 217-222.

van Marum, R.J., 2008. Current and future therapy in Alzheimer's disease. *Fundam Clin Pharmacol* 22, 265-274.

Vance, D.E., Schneider, W.J., 1981. Conversion of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine. *Methods Enzymol* 71 Pt C, 581-588.

Vance, J.E., Pan, D., Vance, D.E., Campenot, R.B., 1991. Biosynthesis of membrane lipids in rat axons. *J Cell Biol* 115(4), 1061-1068.

Vargaftig, B.B., Chignard, M., Benveniste, J., Lefort, J., Wal, F., 1981. Background and present status of research on platelet-activating factor (PAF-acether). *Ann N Y Acad Sci* 370, 119-137.

Vaswani, K.K., Ledeen, R.W., 1989. Purified rat brain myelin contains measurable acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferase(s) but little, if any, glycerol-3-phosphate acyltransferase. *J Neurochem* 52, 69-74.

Vautier, S., Lacomblez, L., Chacun, H., Picard, V., Gimenez, F., Farinotti, R., Fernandez, C., 2006. Interactions between the dopamine agonist, bromocriptine and the efflux protein, P-glycoprotein at the blood-brain barrier in the mouse. *Eur J Pharm Sci* 27, 167-174.

Vestweber, D., Winderlich, M., Cagna, G., Nottebaum, A.F., 2009. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol* 19, 8-15.

Virto, C., Adlercreutz, P., 2000. Lysophosphatidylcholine synthesis with *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435). *Enzyme Microb Technol* 26, 630-635.

Volterra, A., Meldolesi, J., 2005. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6, 626-640.

Vorbrodt, A.W., Dobrogowska, D.H., 2003. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res Brain Res Rev* 42, 221-242.

Wang, P., Anthes, J.C., Siegel, M.I., Egan, R.W., Billah, M.M., 1991. Existence of cytosolic phospholipase D. Identification and comparison with membrane-bound enzyme. *J Biol Chem* 266(23), 14877-14880.

Weylandt, K.H., Kang, J.X., Leaf, A., 1996. Polyunsaturated fatty acids exert antiarrhythmic actions as free acids rather than in phospholipids. *Lipids* 31, 977-982.

White, P.J., St-Pierre, P., Charbonneau, A., Mitchell, P.L., St-Amand, E., Marcotte, B., Marette, A., 2014. Protectin DX alleviates insulin resistance by activating a myokine-liver glucoregulatory axis. *Nat Med* 20(6), 664-669.

Williard, D.E., Harmon, S.D., Kaduce, T.L., Preuss, M., Moore, S.A., Robbins, M.E., Spector, A.A., 2001. Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocytes. *J Lipid Res* 42, 1368-1376.

Woelk, H., Goracci, G., Arienti, G., Porcellati, G., 1978. On the activity of phospholipases A1 and A2 in glial and neuronal cells. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 3:77-83.

Wolburg, H., Lippoldt, A., 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 38, 323-337.

Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E.M., Ocalan, M., Farrell, C., Risau, W., 1994. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 107 (Pt 5), 1347-1357.

Wolf, R.A., Gross, R.W., 1985. Identification of neutral active phospholipase C which hydrolyzes choline glycerophospholipids and plasmalogen selective phospholipase A2 in canine myocardium. *J Biol Chem* 260, 7295-7303.

Wolff, J.R., Bar, T., 1972. 'Seamless' endothelia in brain capillaries during development of the rat's cerebral cortex. *Brain Res* 41, 17-24.

Wong, J.T., Tran, K., Pierce, G.N., Chan, A.C., O, K., Choy, P.C. 1998. Lysophosphatidylcholine stimulates the release of arachidonic acid in human endothelial cells. *J Biol Chem* 273(12), 6830-6836.

Wong, A.D., Ye, M., Levy, A.F., Rothstein, J.D., Bergles, D.E., Searson, P.C., 2013. The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng* 6, 7.

Wurtman, R.J., 2008. Synapse formation and cognitive brain development: effect of docosahexaenoic acid and other dietary constituents. *Metabolism* 57 Suppl 2, S6-10.

Xiao, Y., Huang, Y., Chen, Z.Y., 2005. Distribution, depletion and recovery of docosahexaenoic acid are region-specific in rat brain. *Br J Nutr* 94, 544-550.

Xu, L.Z., Sanchez, R., Sali, A., Heintz, N., 1996. Ligand specificity of brain lipid-binding protein. *J Biol Chem* 271, 24711-24719.

Yamashita, A., Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Ito, M., Oka, S., Tanikawa, T., Waku, K., Sugiura, T., 2014. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid

composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog Lipid Res* 53, 18-81.

Yan, J.J., Jung, J.S., Lee, J.E., Lee, J., Huh, S.O., Kim, H.S., Jung, K.C., Cho, J.Y., Nam, J.S., Suh, H.W., Kim, Y.H., Song, D.K., 2004. Therapeutic effects of lysophosphatidylcholine in experimental sepsis. *Nat Med* 10, 161-167.

Yavin, E., Menkes, J.H., 1974. Incorporation and metabolism of fatty acids by cultured dissociated cells from rat cerebrum. *Lipids* 9(4), 248-253.

Yetukuri, L., Katajamaa, M., Medina-Gomez, G., Seppanen-Laakso, T., Vidal-Puig, A., Oresic, M., 2007. Bioinformatics strategies for lipidomics analysis: characterization of obesity related hepatic steatosis. *BMC Syst Biol* 1, 12.

Yokoyama, M., Origasa, H., Matsuzaki, M., Matsuzawa, Y., Saito, Y., Ishikawa, Y., Oikawa, S., Sasaki, J., Hishida, H., Itakura, H., Kita, T., Kitabatake, A., Nakaya, N., Sakata, T., Shimada, K., Shirato, K., 2007. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet* 369, 1090-1098.

Young, G., Conquer, J., 2005. Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. *Reprod Nutr Dev* 45(1), 1-28.

Yorek, M.A., Figard, P.H., Kaduce, T.L., Spector, A.A., 1985. A comparison of lipid metabolism in two human retinoblastoma cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26(8), 1148-1154.

Zambon, A., Schmidt, I., Beisiegel, U., Brunzell, J.D., 1996. Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 37, 2394-2404.

Zembowicz, A., Tang, J.L., Wu, K.K., 1995. Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase type III by lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem* 270, 17006-17010.